

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA
WYDZIAŁ BUDOWNICTWA
I INŻYNIERII ŚRODOWISKA



POLSKIE ZRZESZENIE INŻYNIERÓW
I TECHNIKÓW SANITARNYCH



MONOGRAFIE

„INŻYNIERIA ŚRODOWISKA – MŁODYM OKIEM”

TOM 24

BIOLOGIA SANITARNA

**pod redakcją
Iwony Skoczko
Janiny Piekutin
Faustyny Adamczuk
Magdaleny Biernackiej**



Białystok 2016

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA
WYDZIAŁ BUDOWNICTWA
I INŻYNIERII ŚRODOWISKA



POLSKIE ZRZESZENIE INŻYNIERÓW
I TECHNIKÓW SANITARNYCH



MONOGRAFIE

TOM 24

BIOLOGIA SANITARNA

MONOGRAFIE

TOM 24

*Patronat
Rektora Politechniki Białostockiej
prof. dr hab. inż. Lecha Dzieńsi*

*Wydział Budownictwa
i Inżynierii Środowiska
Politechniki Białostockiej*



*Honorowy Patronat
Prezydenta
Miasta Białegostoku*

**Publikacja dofinansowana przez
Wojewódzki Fundusz Ochrony Środowiska
i Gospodarki Wodnej w Białymstoku**



Wojewódzki Fundusz
Ochrony Środowiska
i Gospodarki Wodnej
w Białymstoku

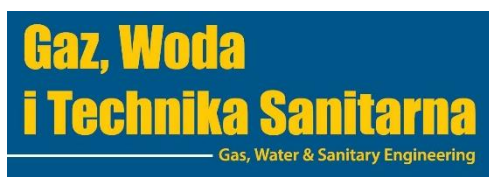
www.wfosigw.bialystok.pl

Serdecznie dziękujemy za pomoc w organizacji uroczystości
i wydaniu niniejszej publikacji.

Patronaty medialne:



POLSKI
instalator



INŻYNIERIA ŚRODOWISKA – MŁODYM OKIEM

TOM 24

BIOLOGIA SANITARNA

**pod redakcją
Iwony Skoczko
Janiny Piekutin
Faustyny Adamskiej
Magdaleny Biernackiej**

Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej
Białystok 2016

Redaktor tomu:

Iwona Skoczko
Janina Piekutin
Faustyna Adamczuk
Magdalena Biernacka

Zespół redakcyjny:

Iwona Skoczko – Redaktor Naczelny
Janina Piekutin – Redaktor Naczelny
Faustyna Adamczuk – skład monografii
Magdalena Biernacka – skład monografii

Redakcja językowa: Autorzy**Recenzenci monografii:**

dr hab. inż. Sławomir Obidziński
dr hab. inż. Iwona Skoczko

Zespół naukowy:

dr hab. inż. Iwona Skoczko – Politechnika Białostocka
prof. dr hab. inż. Józefa Wiater – Politechnika Białostocka
prof. dr hab. inż. Rafał Miłaszewski – Politechnika Białostocka
prof. AlekseyTernovtsev – Kijowski Narodowy Uniwersytet Budownictwa i Architektury
prof. DmitrySpitsov – Moskiewski Państwowy Uniwersytet Budownictwa
prof. Javier Bayo – Uniwersytet Techniczny Cartagena
dr hab. inż. Mariusz Dudziak – Politechnika Śląska
dr hab. Aneta Dorota Petelska – Uniwersytet w Białymstoku
dr hab. Izabella Jastrzębska – Uniwersytet w Białymstoku
dr hab. Zenon Łotowski – Uniwersytet w Białymstoku
dr hab. inż. Jacek Piekarski, prof. PK – Politechnika Koszalińska
dr hab. inż. Urszula Filipkowska, prof. UWM – Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
dr hab. inż. Katarzyna Ignatowicz – Politechnika Białostocka
dr hab. inż. Sławomir Obidziński – Politechnika Białostocka
dr n. tech. Janina Piekutin – Politechnika Białostocka
dr n. tech. Joanna Szczukowska – Politechnika Białostocka
dr inż. Katarzyna Gładyszewska-Fiedoruk – Politechnika Białostocka
dr inż. Anna Siemieniuk – Politechnika Białostocka
dr inż. Elżbieta Grygorczuk-Petersons – Politechnika Białostocka
dr inż. Dariusz Andraka – Politechnika Białostocka
dr inż. Jacek Leszczyński – Politechnika Białostocka

Wszystkie zamieszczone w monografii prace są recenzowane

Copyright by Politechnika Białostocka, Białystok 2016

ISBN 978-83-62582-91-4

Publikacja nie może być w jakikolwiek sposób powielana i rozpowszechniana bez pisemnej zgody posiadacza praw autorskich

Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej

Polskie Zrzeszenie Techników i Inżynierów Sanitarnych Oddział w Białymstoku
ul. M. C. Skłodowskiej 2, 15-950 Białystok
Tel.: 85 744 31 00
e-mail: konferencjapzits@gmail.com
www.pzits.bialystok.pl

SPIS TREŚCI

Bakterie wspomagające proces fitoremediacji zanieczyszczonych gleb.....	9
Katarzyna Czerewko, Anna Gal, Kamil Filipek	
Wykorzystanie grzybów strzępkowych z rodzaju <i>Aspergillus</i> i <i>Penicillium</i> w procesie bioremediacji	33
Anna Gal, Katarzyna Czerewko, Kamil Filipek	
Rola owadów zapylających w ochronie przyrody na przykładzie wiśni karłowatej (<i>Prunus fruticosa</i>)	56
inż. Mateusz Kęsy	
Badanie ilości mikroorganizmów w pofermencie biogazowni Ryboły.....	71
mgr inż. Magdalena Joka, dr inż. Dorota Dec, Anna Maleszewska, Ewelina Filipiuk, Beata Piekutowska, Katarzyna Polewko	
Wpływ zmian klimatu na poziomie lokalnym na kondycję <i>Fraxinus excelsior</i> L. na przykładzie wybranych drzewostanów Nadleśnictwa Babki.....	96
mgr inż. Krzysztof Turczański	
Ocena stanu sanitarnego wybranych studni kopanych na terenie miejscowości Markowo	118
inż. Sylwia Tymosiak, dr inż. Irena Kaszkowiak	
Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza oraz powierzchni płaskich w pomieszczeniach użyteczności publicznej	148
mgr inż. Sebastian Niestępski, mgr inż. Adriana Osińska, inż. Ewa Amenda, Monika Hubacz	
Odpowiedź immunologiczna jako reakcja na bakterie <i>Legionella</i> sp. bytujące w instalacjach wody ciepłej	170
Jakub Knurek	

Ocena mikrobiologicznej czystości powietrza na terenie Schroniska dla zwierząt w Białymstoku	188
inż. Joanna Irena Olejniczak, dr inż. Irena Kaszkowiak	
Stan sanitarny wód rzeki Supraśl w obrębie kąpieliska w Michałowie	214
inż. Łukasz Suproń, dr inż. Irena Kaszkowiak	
Wpływ warunków przechowywania wybranych produktów spożywczych na ich stan higieniczno-sanitarny	241
inż. Marta Troc dr inż. Barbara Błachno	

Katarzyna Czerewko¹⁾, Anna Gal¹⁾, Kamil Filipek²⁾

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Wydział Biologii i Biotechnologii

¹⁾ Zakład Genetyki i Mikrobiologii, ²⁾ Zakład Biologii Molekularnej

Lublin, ul. Akademicka 19

¹⁾katarzyna.czerewko@interia.pl

Bakterie wspomagające proces fitoremediacji zanieczyszczonych gleb

*The strains of microorganisms support the process of phytoremediation
of contaminated site*

Słowa kluczowe: bakterie, fitoremediacja, zanieczyszczenia gleby

Keywords: bacteria, phytoremediation, soil contamination

Streszczenie: Każdego roku coraz bardziej wzrasta zanieczyszczenie naszego środowiska. Może być ono spowodowane czynnikami naturalnymi, jednak główną przyczyną jest działalność człowieka. Szczególnie niebezpieczne są zanieczyszczenia gleby, która silnie je immobilizuje. Do najważniejszych czynników powodujących skażenie gleby należą: odpady przemysłowe, pyły i gazy będące produktami ubocznymi zakładów przemysłowych, a także związki chemiczne stosowane w rolnictwie. Powodują one pogorszenie właściwości zarówno fizycznych, chemicznych jak i biologicznych gleb.

Aktualnie najpoważniejszym problem jest degradacja gleb przez metale ciężkie, pierwiastki promieniotwórcze, węglowodory ropopochodne oraz inne ksenobiotyki organiczne. Konieczność likwidacji tych zanieczyszczeń zmusiła nas do poszukiwania coraz to nowszych metod oczyszczania środowiska. Jedną z najbardziej przyjaznych naturze metod jest fitoremediacja. Polega ona na wykorzystaniu roślin w celu usunięcia z gleby lub stabilizacji w niej szkodliwych substancji.

Pomimo tak wielu zalet fitoremediacja ma również swoje ograniczenia. W związku z tym poszukiwane są mechanizmy, które by ją wspomagały. Jedną z najbardziej obiecujących metod jest wprowadzanie do gleby bakterii, które są zdolne

stymulować wzrost roślin lub w sposób pośredni zwiększać wydajność absorpcji szkodliwych substancji z gleby.

W niniejszej pracy zostaną opisane, na podstawie materiałów przeglądowych, w jaki sposób poszczególne szczepy bakteryjne wspomagają fitoremediację. Opisane zostaną również, mikroorganizmy które najwydajniej wpływają na fitoremediatory gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi i substancjami ropopochodnymi.

1. Wstęp

Zanieczyszczenie naszego środowiska jest problemem o charakterze globalnym. Bardzo szybki rozwój przemysłu powoduje negatywne zmiany w otaczającym nas środowisku. W największym stopniu uwidacznia się on w obrębie gleb, gdyż to one silnie immobilizują zanieczyszczenia. W ostatnim czasie pojawiła się alternatywna metoda w stosunku do tradycyjnych metod oczyszczania środowiska – fitoremediacja [1].

Termin fitoremediacja powstał w wyniku zestawienia dwóch słów pochodzących z języka greckiego *phyton* – roślina oraz łaciny *remediare* – naprawiać. Metoda ta opiera się o wykorzystanie roślin posiadających zdolność do wzrostu w środowisku zawierającym szkodliwe substancje, co prowadzi do ich stabilizacji, dezaktywacji, przenoszenia lub usunięcia z gleb, wód czy osadów. Jest to technika, która może być wykorzystywana do oczyszczania środowiska zarówno z substancji organicznych jak i nieorganicznych. Fitoremediatory powinny zawierać następujące cechy: duża produkcja biomasy, wysoki stopień degradacji szkodliwych związków lub ich immobilizacja w częściach zbieranych jako plon, szybki wzrost, małe wymagania życiowe, zdolność do przeżycia w trudnych warunkach, łatwość uprawy, odporność na szkodniki i choroby oraz brak inwazyjności [1, 2, 3]. Fitoremediacja

jest technologią opłacalną finansowo, przyjazną środowisku oraz nieinwazyjną [4]. Główne wady i zalety tej metody zostały przedstawione w Tabeli 1. Aktualnie wyróżniamy kilka technik fitoremediacji: fitoekstrakcja, fitostabilizacja, fitodegradacja, fitowolatyżacja, fitofiltracja [2].

Tabela 1. Zalety i wady fitoremediacji

Zalety fitoremediacji	Wady fitoremediacji
Oczyszczanie gleb z substancji organicznych i nieorganicznych	Pobieranie szkodliwych związków tylko w strefie korzeniowej rośliny
Może być łączona z innymi metodami	Problem mogą stanowić końcowe metabolity
Zmniejsza ilość odpadów do składowania nawet do 95% i mogą być one wykorzystywane jako biologiczne źródła metali	Zbierana biomasa roślinna po fitoekstrakcji może być klasyfikowana jako niebezpieczne odpady (powinna być usuwana)
Możliwość stosowania <i>in/ex situ</i> zarówno do faz wodnych, np. ścieki jak i gleb	Może trwać nawet do kilku lat w celu osiągnięcia pożądanego efektu
Jest napędzana energią słoneczną - ekologiczna	Nie można stosować do wszystkich związków
Przy stosowaniu na dużą skalę biomasa może być wykorzystywana do wytwarzania energii cieplnej	Utylizacja zanieczyszczonej gleby jest powodem do niepokoju
Nie wymaga drogiego sprzętu lub wysoko wykwalifikowanych pracowników	Wprowadzanie gatunków obcych może wpływać na bioróżnorodność

Stosowanie <i>in situ</i> fitoremediacji zmniejsza rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń	Warunki klimatyczne są czynnikiem ograniczającym
--	---

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [16,17,18]

2. Cel i zakres pracy

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie, na podstawie materiałów przeglądowych, podstawowych metod fitoremediacji. Opisanie zostaną również najczęściej używane fitoremediatory. W pracy poruszone zostaną zagadnienia dotyczące mikroorganizmów, które mogą zwiększać efektywność fitoremediatorów oraz mechanizmy jakie nimi kierują.

3. Techniki fitoremediacji

3.1. Fitoekstrakcja

Rośliny, aby się rozwijać i zakończyć pełen cykl życiowy potrzebują nie tylko wody, CO₂, O₂ czy promieni słonecznych, ale także makroelementów (K, N, P, S) i mikroelementów (Mn, Fe, Zn, Ni, Cu i Mo). Rośliny cały czas dążyły do udoskonalenia mechanizmów pobierania, transportowania i przechowywania tych metali w obrębie swoich tkanek. W przepływie metali pośredniczą białka o funkcjach transportowych znajdujące się błonach biologicznych. Wychwyt jonów cechuje selektywność i zależy od struktury oraz właściwości tych błonowych transporterów. Szczególnie intensywny u fitoakumulatorów jest transport ksylemowy. Przepływ metali z ksylemu do pędów odbywa się dzięki transporterom zlokalizowanym w ich błonie komórkowej. W pędach mikro- jak i makroelementy zlokalizowane są na obszarze symplastu i apoplastu [6,7,8].

Fitoekstrakcja jest metodą polegającą na usuwaniu metali ciężkich oraz związków radioaktywnych z zanieczyszczonych gleb i osadów. Imobilizacja jonów metali odbywa się poprzez redukcję związkami chelatującymi. Do chelatorów możemy zaliczyć: fitochelatyny, kwasy organiczne (cytrynian, jabłczan), aminokwasy, peptydy i białka. Jednym z najważniejszych aminokwasów zaangażowanych w hiperakumulację jest histydyna. Tworzy ona stabilne kompleksy z Zn, Ni i Cd u *Alyssum lesbiacum* [6]. Metale na początku są pobierane przez korzenie rośliny, transportowane w ksylemie zaś następnie ulegają akumulacji w komórkach nadziemnych części roślin (liście, pędy, łodyga) [1, 5]. Następny etap obejmuje, po zakończeniu okresu wegetacji, zbiór i degradację fitoakumulatorów [4].

Zdolność do akumulacji lub usuwania zanieczyszczeń pomiędzy poszczególnymi gatunkami bardzo się różni. Różnice te wynikają przede wszystkim z uwarunkowań anatomicznych, genetycznych, anatomicznych, a także zależy od mechanizmu jaki posiada roślina. Na szczególną uwagę zasługują tutaj hiperakumulatory. Hiperakumulatory są to rośliny, który są zdolne do akumulacji bardzo dużej ilości szkodliwych związków wewnątrz swoich tkanek. Należą one do grupy metalofitów. Przykłady hiperakumulatorów zostały przedstawione w Tabeli 2 [7,9]. Aktualnie do tej grupy zalicza się około 500 gatunków, które należą do 101 rodzin. Do najważniejszych można zaliczyć: *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Cunouniaceae* oraz *Fabaceae* [9].

Tabela 2. Hiperkumulatory

Metal	Symbol chemiczny	Gatunek rośliny	Bioakumulacja [mg kg⁻¹]
Nikiel	Ni	<i>Psycotria vanhermanni</i>	35720,0
		<i>Alyssum syriacum</i>	10200,0
		<i>Brassica juncea</i>	3916,0
Mangan	Mn	<i>Maytenus bureaviana</i>	33750,0
		<i>Alyxia rubricalis</i>	14000,0
Cynk	Zn	<i>Dichapetalum</i>	30000,0
		<i>gelonioides</i>	19410,0
		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
Miedź	Cu	<i>Aeolanthus biformifolius</i>	9000,0
		<i>Sorghum sudanense</i>	5330,0
Ołów	Pb	<i>Noccaea rotundifolium</i>	8200,0
Chrom	Cr	<i>Eichhornia crassipes</i>	6000,0
		<i>Phragmites australis</i>	4825,0
		<i>Zea mays</i> L. Cv Ganga5	2538,0

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [9,10,12]

3.2. Fitostabilizacja

Fitoremediacja służy, jak już wcześniej wspomniano, do oczyszczania skażonego środowiska. Niektóre tereny charakteryzują się wysokim stopniem zanieczyszczenia toteż usuwanie szkodliwych związków przy pomocy fitoekstrakcji byłoby bardzo czasochłonne. Alternatywną metodą jest fitostabilizacja. Technika ta wykorzystuje rośliny do zatrzymywania metali w glebie poprzez adsorpcję tych

pierwiastków w korzeniach roślin oraz wytrącanie w strefie ryzosfery. Rośliny pełnią tu bardzo ważne funkcje, gdyż powodują fizyczną stabilizację gruntów o zwartym systemie korzeniowym, przyczyniają się do zmniejszenia erozji wietrznej i wodnej oraz prowadzą do wytrącenia szkodliwych jonów, ograniczając w ten sposób ich biodostępność [11,12].

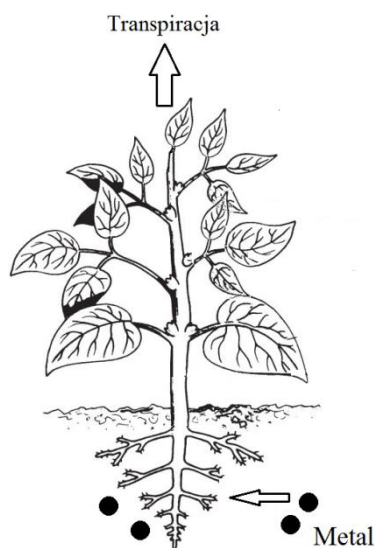
Idealny fitostabilizator powinien [4,12]:

- być odporny na zmiany w warunkach glebowych,
- charakteryzować się wysoką tolerancją w stosunku do szkodliwych związków,
- posiadać zwarty system korzeniowy,
- wykazywać szybki wzrost tworząc pokrywę roślinną gleby,
- posiadać wysoki stopień biokoncentracji oraz niski współczynnik translokacji do części nadziemnych [4,12].

Najczęściej w fitostabilizacji są stosowane rośliny z rodziny *Gramineae* oraz *Leguminosae*. Technika ta daje największe efekty terenach bogatych w gleby drobnoziarniste i materię organiczną [4].

3.3. Fitowolatyżacja (fitotranspiracja)

Mechanizm fitowolatyżacji opiera się na zdolności do pobierania zanieczyszczeń przez system korzeniowy roślin, a następnie obejmuje transport do różnych części nadziemnych, gdzie ulegają wyparowaniu przez aparaty szparkowe (Rysunek 1).



Rysunek 1. Proces fitowolatytacji

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [14]

Pobrane, toksyczne substancje są przekształcane w komórkach roślinnych w mniej toksyczne o charakterze lotnych związków. Na przykład utlenienie selenu polega na włączaniu jego nieorganicznych form do kwasów organicznych, które mogą być biometylowane w celu utworzenia lotnego selenku dimetylu. Takie zjawisko występuje między innymi u *Brassica juncea*. Warto także wspomnieć o *Pteris vittata*. Jest to gatunek rośliny bardzo skuteczny w fitotranspiracji, gdyż powoduje on wyparowanie aż do 90% zaadsorbowanego arsenu [13]. Technika ta wykorzystuje również rośliny transgeniczne. Do genomu *Arabidopsis thaliana* wprowadzono bakteryjny gen *merA*, który koduje syntezę enzymu odpowiedzialnego za redukcję toksycznej formy jonu Hg^{2+} do mniej szkodliwej formy Hg^0 - reduktazy rtęciowej [14]. Podczas stosowania fitowolatytacji należy zwrócić uwagę na objętość wyemitowanego związku do atmosfery. Ważne jest aby dana ilość nie wpływała w dużym stopniu na dotychczasowy skład atmosfery i nie

powodowała negatywnych skutków w środowisku.

3.3.1. Fitodegradacja

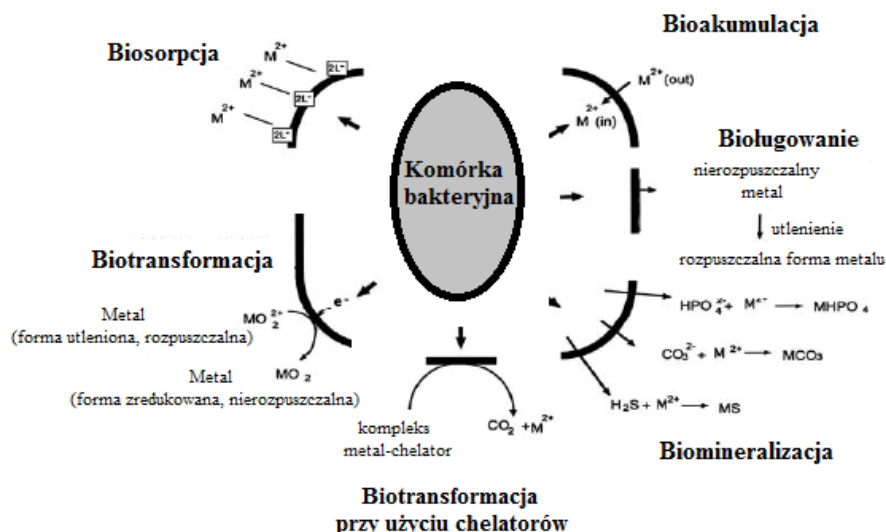
Kolejną techniką fitoremediacji jest fitodegradacja. Metoda ta polega pobieraniu przez niektóre gatunki roślin szkodliwych substancji, po czym zachodzi ich transformacja przy pomocy specyficznych enzymów. Zanieczyszczenia mogą być rozkładane zarówno wewnętrznie jak i zewnętrznie przez kompleksy enzymatyczne. Fitodegradacja ma zastosowanie przy rozkładzie zanieczyszczeń organicznych takich jak: trichloroetylen (TCE), herbicydy, fenole, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAHs) oraz substancji ropopochodnych [1,15].

4. Bakterie wspomagające proces fitoremediacji

Fitoremediacja stanowi alternatywę w stosunku do innych metod oczyszczania środowiska. Rośliny stosowane w fitoremediacji mają swoje ograniczenia. Aktualnie naukowcy poszukują metod, które by podnosiły efektywność roślin w oczyszczaniu środowiska z zanieczyszczeń. Podjęto próby zwiększania tolerancji na toksyczne substancje, uprawnienia transportu pobranych związków w tkankach oraz poprawę zdolności do akumulacji. Bardzo dużą rolę pełni tu inżynieria genetyczna, która pomaga usprawniać ten proces [19]. Organizmy prokariotyczne są mniej wrażliwe na toksyczne działanie metali niż organizmy eukariotyczne. W trakcie ewolucji wykształciły mechanizmy oporności w stosunku do szkodliwych związków. Należą do nich: regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia metali połączona z ekspresją białek transportujących kompleksy metal-ligand z cytoplazmy do wakuoli,

a wpływ jonów metali przez kanały jonowe znajdujące się w ścianie komórkowej, produkcja peptydów z rodziny białek wiążących. Geny kodujące tego typu mechanizmy mogą być zlokalizowane w obrębie bakteryjnego genomu, lecz w większości przypadków kodowane są na plazmidach [20].

Na Rysunku 2 zostały przedstawione oddziaływania metal-bakteria, które zwiększają potencjał fitoremediacyjny. Biosorpcja polega na zatrzymywaniu zanieczyszczeń wewnątrz organizmów żywych. Jest to proces pasywny, zależny od rodzaju użytego biosorbentu. Zachodzi on w ścianie komórkowej drobnoustroju. Biotransformacją można nazwać enzymatyczne przekształcenie związków bardziej toksycznych w mniej toksyczne, której odmianą biotransformacja przy użyciu chelatorów. Bakterie mogą reagować z metalami w procesie bioługowania – utlenienia minerałów nierozpuszczalnych w wodzie do form rozpuszczalnych. Następnym procesem jest bioakumulacja, która charakteryzuje się gromadzeniem zanieczyszczeń środowiska w żywych mikroorganizmach oraz biomineralizacja – proces przekształcania pierwiastków metali w minerały w celu usztywnienia własnych struktur.



Rysunek 2. Interakcje metal-bakteria podnoszące efektywność procesu fitoremediacji

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [36]

Jak do tej pory w fitoremediacji zastosowano: inokulację endofitami, PGPR oraz grzybami mikoryzowymi [19].

4.1. Inokulacja bakteriami

Gleba stanowi naturalne środowisko życia bakterii. Bioróżnorodność tych mikroorganizmów jest ogromna. Wpływają one na właściwości zarówno fizyczne jak i chemiczne gleb. Bardzo ważne jest też, w jaki sposób oddziałują na bytujące w glebie organizmy oraz jaki wpływ będą miały na rośliny. Bakterie mogą powodować pozytywny efekt u do roślin poprzez [19,21]:

- produkcję bakteriocyn, antybiotyków, które będą hamowały rozwój patogennych drobnoustrojów,

- ograniczanie adsorpcji substancji ograniczających ich wzrost i rozwój roślin,
- produkcję związków potrzebnych do prawidłowego rozwoju roślin,
- wydzielenie do środowiska sideroforów powodujących zwiększenie przyswajalności niektórych pierwiastków [19, 21].

4.1.1. Antybiotyki

Antybiotyki są wtórnymi produktami metabolizmu mikroorganizmów. Mają one działanie bakteriobójcze jak i bakteriostatyczne w zależności od stężenia. Związki produkowane przez te grupy drobnoustrojów mogą skutecznie eliminować patogeny zagrażające roślinom i w ten sposób przyczynić się do zwiększenia potencjału fitoremediacyjnego. Wytwarzają je w największej ilości promieniowce – *Streptomyces coelicolor* (aktynorodyna), *Streptomyces achromogenes* (streptozotocyna), *Streptomyces aeuropaciens* (chlorotetracyklina), grzyby – *Penicillium chrysogenum* (penicylina G i V), *Penicillium griseofulvum* (gryzeofulwina), *Acremonium chrysogenum* (cefalosporyna C) oraz bakterie – *Pseudomonas spp.* (pirolnityna,), *Bacillus licheniformis* (bacytracyna), *Bacillus brevis* (gramicydyna) [22,23].

4.1.2. Bakteriocyny

Bakterie oprócz antybiotyków wytwarzają także bakteriocyny. Bakteriocyny różnią się od nich przede wszystkim spektrum działania i toksycznością w stosunku do innych mikroorganizmów. Rodzina bakteriocyn obejmuje białka i peptydy o charakterze bakteriobójczym lub bakteriostatycznym w stosunku do tych samych szczepów. Klaenhamer

twierdzi, iż 99% bakterii jest zdolnych do wytworzenia chociaż jednej bakteriocy. W świecie drobnoustrojów są wydzielane zarówno przez bakterie Gram dodatnie jak i Gram ujemne. U bakterii Gram ujemnych można je podzielić na dwie grupy: kolicyny, mikrocyny. Do najważniejszych producentów można zaliczyć *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*. Bakteriocy bakterii Gram dodatnich rozdzielono na 3 klasy: lantybiotyki, bakteriocy Nielantybiotykowe, bakteriocy wysokocząsteczkowe, kompleksy białko-lipidowe lub białkowo-węglowodanowe. Głównymi przedstawicielami są bakterie LAB - *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* [24 ,25 ,26].

4.1.3. Siderofory

Siderofory są kolejną grupą związków produkowaną przez bakterie i grzyby. Pełnią one bardzo ważną rolę w promowaniu wzrostu roślin. Siderofory mają charakter niskocząsteczkowych związków o niebiałkowym i nieporfirynowym profilu. Stanowią grupę związków chemicznych chelatujących jony metali z trudnodostępnych kompleksów. Służą one przede wszystkim do pozyskiwania żelaza, atakże innych pierwiastków takich jak: glin, kadm, miedź, gal, indol, cynk. Siderofory są produkowane głównie przez szczepy *Pseudomonas* - *Pseudomonas aeruginosa* (piowerdyna), *Pseudomonas fluorescens* (chinolobaktyna), *Pseudomonas stutzeri* (nokardamina) oraz *Burkholderia cepacia* (pichelina) [27, 28, 29].

Inokulacja roślin biorących udział w fitoremediacji zwiększa ich potencjał poprzez [27, 28, 29]:

- zwiększenie dostępności pierwiastków niezbędnych do prawidłowego wzrostu (lepszy przyrost biomasy),
- zwiększenie tolerancji na obecność większych stężeń metali w glebie,
- poprawę akumulacji pierwiastków w tkankach.

Poza tym synteza chelatorów metali jest jednym z głównych czynników powodujących zahamowanie rozwoju bakteryjnych i grzybiczych patogenów roślin. Potwierdzono, iż *Pseudomonas* sp. wykazują działanie antagonistyczne w stosunku do *Phytophthora capsici*, *Fusarium* spp., *Heterobasidion annosum* – patogenów grzybowych roślin. Skuteczne działanie *Pseudomonas* jest spowodowane chelatowaniem jonów Fe, co ogranicza dostępność w środowisku tego pierwiastka, który jest im niezbędny do prawidłowego funkcjonowania [27, 28, 29].

4.2. Endofity

Termin endofit odnosi się do wszystkich mikroorganizmów kolonizujących bezobjawowo wewnętrzne tkanki roślinne (gospodarza). Endofityczne bakterie wyizolowano zarówno z roślin jednoliściennych jak i dwuliściennych – drzew (grusza, dąb), roślin uprawnych (buraki cukrowe, kukurydza) [30]. Endofity należą do bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, których najważniejszymi przedstawicielami są: *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Xanthomonas*, *Methylobacterium*. Ponadto każda roślina może mieć więcej niż jeden gatunek endofita, co przedstawia Tabela 3.

Tabela 3. Endofity i ich gospodarze

Gospodarz	Endofit
Rośliny cytrusowe	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Methylobacterium extorquens</i> , <i>M. mesophilicum</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
Kukurydza	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> ,
Ryż	<i>Azorhizobium caulinodans</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i>
Marchew	<i>Klebsiella terrigena</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .
Pszenica	<i>Azorhizobium sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i>

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [29, 30]

Bakterie wnikają do organizmu roślinnego przez: korzenie, uszkodzone, zranione tkanki, naturalnie występujące otwory typu hydatody, mikropory, pory. Mikroorganizmy kolonizują również nasiona.

W roślinach największa ilość endofitów znajduje się w korzeniach w porównaniu z częściami nadziemnymi (łodyga, liście). Niektóre rośliny propagujące wegetatywnie, tak jak ziemniaki czy trzcina cukrowa, przekazują komórki bakteryjne z pokolenia na pokolenie. Bardzo często sygnałem do rozpoczęcia zasiedlania tkanek roślinnych jest wydzielenie przez gospodarza flawonoidów. Przykładem może być infekcja pszenicy przez *Azorhizobium caulinodans* lub *Azospirillum brasilense* po uprzednim wydzieleniu tych związków przez roślinę. Liczne badania mikroskopowe potwierdzają, iż endofity znajdują się w korzeniach, łodydze, liściach i kwiatach. Mogą być też skupione w ściśle określonych tkankach takich jak ksylem, łyko, kora korzenia lub zasiedlić fragmenty systemu naczyniowego [30, 31].

W porównaniu z bakteriami ryzosferowymi endofity mogą ściślej współdziałać ze swoim gospodarzem. Gospodarz dostarcza substancji odżywczych i miejsca do rozwoju, zaś bakterie endofityczne mogą wpływać bezpośrednio lub pośrednio na poprawę wzrostu roślin. Bezpośrednie mechanizmy mogą obejmować produkcję regulatorów wzrostu roślin takich jak gibereliny, auksyny, cytokininy, wiązanie azotu, dostarczanie jonów metali. Mikroorganizmy są również zdolne do hamowania syntezy etylenu, ponieważ syntetyzują deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (deaminaza ACC). Pośrednie wspieranie wzrostu roślin przez endofity może się odbywać na drodze antybiozy, współzawodnictwa o miejsce do rozwoju i składniki odżywcze uniemożliwiając tym samym wzrost lub aktywność patogenów, wydzielania różnego rodzaju enzymów: proteolityczne, hydrolityczne, oraz indukując mechanizmy obronne przeciwko patogenom [30, 31, 32].

Tabela 4 przedstawia wpływ przykładowych endofitycznych gatunków bakterii na rośliny.

Tabela 4. Przykłady pozytywnych oddziaływań ednofitów na rośliny

Gatunek encofita	Rola	Wpływ na roślinę
<i>Azospirillum brasilense</i>	Wytwarzanie kwasu indoliloctowego (IAA)	Wydłużenie głównego korzenia i korzeni bocznych
	Obniżenie energii potrzebnej na akumulację suchej masy	Wzrost biomasy
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> ,	Wiązanie azotu	Dostarczenie N
<i>Arthrobacter koreensis</i>	Zdolność do produkcji kwasu abscynowego i jasmonowego	Wspomaganie kiełkowania, kwitnienia
<i>Bacillus cepacia</i>	Zdolność do rozkładu toluenu	Możliwość wzrostu w glebach zawierających duże stężenia toluenu, bez objawów fitotoksyczności
<i>Bacillus pumilus</i>	Produkcja kwasu salicylowego	Szybszy wzrost i kiełkowanie, Obrona przed stresem abiotycznym
<i>Colletotrichum sp.</i>	Wytwarzanie biopolimerów powodujące lignifikację ścian komórkowych roślin	Indukowanie systemicznej odporności, Zwiększenie bariery ochronnej przed patogenami

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hamowanie rozwoju patogenów <i>Fusarium oxysporum</i> i <i>Erwinia carotovora</i> poprzez zwiększenie, do poziomu toksycznego dla tych mikroorganizmów, stężenia Fe w środowisku	Ochrona rośliny
	Wydzielanie pyrolnitriny, która zwalcza <i>Rhizoctonia solani</i>	Ochrona rośliny (siewka bawełny)

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [31, 32, 33, 34]

4.3. PGPR

Bakterie ryzosferowe promujące wzrost roślin (PGPR) należą do grupy mikroorganizmów zwiększających potencjał fitoremediacji. Ryzosfera obejmuje środowisko glebowe oraz korzenie roślinne modyfikujące jej właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne. Korzeniom zawsze towarzyszy zespół mikroorganizmów, który wchodzi z nimi w interakcje. Korzyść z oddziaływania jest obopólna gdyż roślina wytwarza substancje stanowiące związki wzrostowe, zaś drobnoustroje biorą udział w szeregu mechanizmów obronnych oraz produkcji regulatorów wzrostu. Istotną funkcję, jak już wcześniej wspomniano, pełnią we wspomaganiu fitoremediacji [35,36,37]. Przykładowo gatunki z rodzaju *Pseudomonas* współdziałające z *Pteris vittata* powodują możliwość wzrostu tych roślin na glebach zanieczyszczonych arsenem. Z kolei obecność w ryzosferze *Phragmites* sp. mikroorganizmów opornych na miedź pozwala na uprawę tej rośliny na terenach skażonych

Cu [38]. Ważne jest, aby dobrze dobrać gatunek bakterii do gatunku rośliny, tak aby pozytywnie na siebie oddziaływały, w przeciwnym wypadku efekt może być odwrotny.

5. Podsumowanie

Fitoremediacja jest alternatywną metodą w stosunku do innych technik oczyszczania środowiska. Posiada ona bardzo dużo zalet, przede wszystkim jest ekologiczna i bezpieczna, w związku z tym jest coraz częściej stosowana. Podstawowymi technikami fitoremediacji są: fitoekstrakcja, fitostabilizacja, fitodegradacja, fitowolatyżacja, fitofiltracja. Fitoremediacja ma również swoje ograniczenia, toteż naukowcy poszukują metod, które podnosiłyby jej efektywność w oczyszczaniu środowiska. Główną funkcję w zwiększaniu potencjału fitoremediacyjnego pełnią bakterie, które poprzez wytwarzanie związków wspomagających wzrost roślin, tj. substancji eliminujących patogeny roślinne, dostarczanie pierwiastków, podniesienie poziomu tolerancji na metale ciężkie. Nowych możliwości dostarcza też inżynieria genetyczna, która pomaga usprawniać ten proces poprzez tworzenie coraz to nowszych, transgenicznych roślin i mikroorganizmów, które w przyszłości będą efektywniej oczyszczać nasze środowisko z zanieczyszczeń.

Literatura

1. Marecik R., Króliczak P., Cyplik P., *Fitoremediacja – alternatywa dla tradycyjnych metod oczyszczania środowiska*. Biotechnologia, 3 (74), 2006, str. 88–97.

2. Rabęda I., Woźny A., Krzesłowska M., *Bakterie i grzyby mikoryzowe zwiększają wydajność roślin w fitoremediacji metali śladowych*. Kosmos, 3-4, 2011, str. 423–433.
3. Lone M. I., He Z., Stoffella P. J., Yang X., *Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives*. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2008, 9 (3), str. 210–220.
4. Grobelak A., Kacprzak M., Fijałkowski K., *Fitoremediacja – niedoceniony potencjał roślin w oczyszczaniu środowiska*. Journal of ecology and health, 14(6), 2010, str. 276-280.
5. Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P., *Phytomining: A review*. Minerals Engineering, 22(12), 2009, str. 1007-1019.
6. Verbruggen N., Hermans C., Schat H., *Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants*. New Phytologist, 181(4), 2009, str. 759–776.
7. Kim S.A., Guerinot M.L., *Mining iron: iron uptake and transport in plants*. FEEBS Letters, 581(12), 2007, str. 2273–2280
8. Lasat M.M., *Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms*. Journal of Environmental Quality, 31(1), 2002, str. 109-20.
9. Sarma H., *Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology*. Journal of Environmental Science and Technology, 4, 2011, str. 118-138.
10. Krzciuk K., *Hiperakumulatory roślinne - charakterystyka, badania i znaczenie praktyczne*. Kosmos, 64(2), 2015, str. 293-304.
11. Frérot H., Lefèbvre C., Gruber W., Collin C., Dos Santos A., Escarré J., *Specific Interactions between Local Metallicolous Plants*

- Improve the Phytostabilization of Mine Soils.* Plant and Soil, 282(1), 2006, str. 53-65.
12. Marques A. P. G. C., . Rangel A.O. S. S., Castro P. M. L., *Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils: Phytoremediation as a Potentially Promising Clean-Up Technology.* Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 39(8), 2009, str. 622-654.
 13. Sakakibara M., Watanabe A., Inoue M., Sano S. Kaise T., *Phytoextraction And Phytovolatilization Of Arsenic From As-Contaminated Soils By Pteris vittata.* Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy, 12, 2007, str. 267-272.
 14. Rugh C.L., Wilde H.D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O., Meagher R.B., *Mercuric ion reduction and resistance in transgenic Arabidopsis thaliana plants expressing a modified bacterial merA gene.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(8), 1996, str. 3182–3187.
 15. Gill M., *Phytoremediation: green technology to clean the environment.* International Journal Of Advanced Research, 2(8), 2014, str. 879-886.
 16. Lorestani B., Cheraghi M., Youselfi N., *Acumulation of Pb, Fe, M, N, C, U and Zn in plants and choice of hyperaccumulator plant in the industrial town Vian, Iran.* Archives of Biological Science Belgrade 63 (3), 2011, str. 739-745.
 17. Trapp S., Karlson u., *Aspects of Phytoremediation of Organic Pollutants.* Journal of Soils and Sediments, 1(1) 2001, str. 37-43.

18. Ghosh M., Singh S.P., *A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts*. Asian Journal on Energy and Environment, 6(04), 2005, str. 214-231.
19. Rabęda I., Woźny A., Krzesłowska M., *Bakterie i grzyby mikoryzowe zwiększają wydajność roślin w fitoremediacji metali śladowych*. Kosmos, 3-4(292-293), 2011, str. 423-433.
20. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/17260.pdf> [28.02.2016]
21. Riley M.A., Wertz J. E., *Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application*. Annu. Rev. Microbiol. 56, 2002, str. 117–37.
22. Chaudhary AK., Singh B., Maharjan S., Jha AK., Kim B.G., Sohng J.K., *Switching antibiotics production on and off in actinomycetes by an IclR family transcriptional regulator from Streptomyces peucetius ATCC 27952*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(8), 2014, str. 1065-72.
23. Solecka J., Ziemska J., Rajnisz A., Laskowska A., Guśpiel A., *Promieniowce - występowanie i wytwarzanie związków biologicznie czynnych*. Postępy Mikrobiologii, 52(1), 2013, str. 83-91.
24. Fulekar M.H., Singh A., Bhaduri A.M., *Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals*. African Journal of Biotechnology, 8, 2009, str. 529–535.
25. Klaenhamer, T. R. *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol Review, , 12, 1993, str. 39-86.
26. Güllüce M., Karaday M., Bar Ö. *Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials*. Microbial pathogenes and strategies for combating them: science, technology, education, 2, 2013, str. 1016-1027.

27. Jankiewicz U., *Synthesis of siderophores by soil bacteria of the genus Pseudomonas UNDER VARIOUS CULTURE CONDITIONS*. Acta Sci. Pol., Agricultura 5(2), 2006, str. 33-44.
28. Rajkumar M., Noriharu A., Freitas H., *Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction*. Chemosphere 77, 2010, str. 153–160.
29. Jankiewicz U., Charakterystyka i znaczenie piowerdyn bakterii z rodzaju Pseudomonas., Postępy Mikrobiologiczne, 48(2), 2009, 243-254.
30. Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B, Taghavi S., Mezgeay M., Lelie D. *Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 2002, str. 583–606.
31. Rosenblueth M., Martínez-Romero E., *Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts*. 19(8), Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 2006, str. 827-837.
32. Kłama J., *Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami*. Acta Sci. Pol., Agricultura 3(1), 2004, str. 19-28.
33. http://www.postepybiochemii.pl/pdf/4_2015/398-402.pdf
[dostęp:26.02.2016]
34. Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D., *Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants*. Nature Biotechnology, 22(5), 2004, str. 583-8.
35. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Oves M., *Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils*. Environmental Chemistry Letters, 7, 2009, str. 1 –19.

36. Hinsinger P., Vetterlein A.G.B.D., Young I.M., *Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance*. Plant Soil, 321, 2009, str. 117–152.
37. Jaiswal S., *Role of Rhizobacteria in Reduction of Arsenic Uptake by Plants: A Review*. Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2(4), 2011, str. 1-4.
38. Kamaludeen S.P.B., Ramasamy K., *Rhizoremediation of metals: harnessing microbial communities*. Indian J. Microbio., 48, 2008, str. 80–88.

Anna Gal¹⁾, Katarzyna Czerewko, Kamil Filipek
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
¹⁾galanna9@gmail.com

Wykorzystanie grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* w procesie bioremediacji

*The use of filamentous fungi of the genus Aspergillus and Penicillium
in the process of bioremediation*

Słowa klucze: *bioremediacja, grzyby strzępkowe, Aspergillus, Penicillium*

Keywords: *bioremediation, filamentous fungi, Aspergillus, Penicillium*

Streszczenie: W inżynierii środowiska znanych jest wiele rozmaitych metod służących do walki ze zjawiskiem wciąż upowszechniającego się problemu zanieczyszczeń wód i gruntów, jednak szczególną uwagę zwraca się na zastosowanie tzw. technologii bioremediacji. Metoda ta stanowi proces biologiczny, który w dużym uproszczeniu polega na całkowitym usunięciu, neutralizacji lub obniżeniu stężenia substancji toksycznych do niezagrażającego poziomu, z wykorzystaniem metabolizmu mikroorganizmów. Ma ono zastosowanie w dekontaminacji węglowodorów ropopochodnych, związków organicznych, pestycydów, metali ciężkich oraz wielu innych substancji uwalnianych do środowiska przez różne gałęzie przemysłu. Znaczącą zaletą jest możliwość stosowania procesu *in situ*, czyli na obszarze skażenia. Początek technologii bioremediacji sięga około połowy XX w. kiedy to wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem bakterii i grzybów w degradacji ksenobiotycznych związków organicznych. Początkowo badania nad grzybami zostały porzucone na rzecz bakterii, przy których osiągnano szybkie i obiecujące rezultaty. Dziś udział grzybów w procesie oczyszczania środowiska jest nieoceniony. Grzyby w naturze są bardzo istotne w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów glebowych poprzez zdolność rozkładu materii organicznej. Ogromne znaczenie mają tu, wykorzystywane stosunkowo niedawno grzyby strzępkowe z rodzaju *Aspergillus* oraz *Penicillium*. Liczne szczepy

tych mikroorganizmów izolowane są z miejsc, w których występuje duże skażenie określonym związkiem toksycznym lub metalem ciężkim.

1. Wstęp

Dynamiczny rozwój nowoczesnej gospodarki, obejmujący szeroki zakres różnych gałęzi przemysłu, transportu czy rolnictwa oraz postępująca urbanizacja, wiążą się nierozzerwalnie z uwalnianiem do środowiska znacznej ilości odpadów i zanieczyszczeń. Problem dotyka gleby, powietrza oraz różnych typów wód (wód głębinowych, rzek, jezior czy mórz) [1]. Zależnie od źródła, zanieczyszczenia mogą mieć rozmaity charakter i reprezentować różne poziomy szkodliwości.

Stosuje się różne sposoby klasyfikacji odpadów oparte o kryteria obejmujące właściwości biologiczne, fizykochemiczne, ekonomiczne i technologiczne. Obejmują one w głównej mierze takie cechy, jak źródło odpadów, rodzaj surowca, stan skupienia, skład chemiczny, stopień toksyczności i zagrożenia dla środowiska oraz potencjał przemysłowy (stopień przydatności) odpadu. Wszelkie międzynarodowe klasyfikacje oparte są na opracowaniach EKG (Europejska Komisja Gospodarcza), EWG (Europejska Wspólnota Gospodarcza) i RWPG (Rada Wzajemnej Pomocy Gospodarczej), z tym że najpowszechniej obowiązującym jest system klasyfikacji EKG. System ten wyróżnia 4 podstawowe kategorie podziału tzn. grupy, typy, gatunki oraz rodzaj odpadów [5].

Odpadami, które najsilniej oddziałują na środowisko naturalne wydają się być odpady generowane na różnych etapach procesu przemysłowego, obejmujących proces produkcji, etap użytkowania oraz utylizacji danego produktu przemysłowego (Tabela 1) [2, 3].

Tabela 1. Przykłady odpadów generowanych przez wybrane rodzaje przemysłu

RODZAJ PRZEMYSŁU	TYPY ODPADÓW
Przemysł chemiczny	Kwasy i zasady Rozpuszczalniki Odpady reaktywne Ścieki Składniki organiczne
Przemysł drukarski	Roztwory ,metali ciężkich Tusze, farby drukarskie Rozpuszczalniki
Przemysł naftowy i rafineryjny	Benzen i jego pochodne Odpady procesu rafineryjnego
Przemysł skórzany	Toluen i benzen
Przemysł papierniczy	Barwniki Metale ciężkie Rozpuszczalniki palne
Przemysł budowlany	Mocne kwas i zasady Rozpuszczalniki
Przemysł hutniczy	Metale ciężkie Odpady cyjankowe

Źródło: Opracowanie własne na podstawie: Introduction to the National Pretreatment Program, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC (2011) EPA-833-B-11-001. pp. 1-1, 1-2. http://www.safewater.org/PDFS/resourcesknowthefacts/Cleaning_Up_Pollution.pdf, [dostęp: 19.02.2016r].

Problem zanieczyszczeń tego rodzaju odpadami pojawił się w XVIII wieku, kiedy to miała miejsce wielka rewolucja przemysłowa, polegająca na wprowadzeniu mechanicznej produkcji fabrycznej. Dalszy postęp technologiczny przyczynił się do wyraźnego wzrostu ilości odpadów. Liczba ta szacowana była na 4,5 mln po II Wojnie Światowej. W ciągu kolejnych 30 lat poziom zanieczyszczenia osiągnął 57 mln ton

i aż 265 mln ton do roku 1990 [3]. Obecny stan globalnego poziomu zanieczyszczenia sięga 318 mln ton, z czego 60 mln ton stanowią odpady szkodliwe dla zdrowia i środowiska naturalnego [4]. Negatywne oddziaływanie odpadów przemysłowych polega na ich toksycznych, silnie reaktywnych, żrących lub palnych właściwościach [1]. W klasyfikacji odpadów przemysłowych spotykany jest często podział na odpady niebezpieczne i inne niż niebezpieczne.

Odpady niebezpieczne:

- odpady i lakiery zawierające rozpuszczalniki organiczne
- farby, tusze, farby drukarskie, kleje, żywice
- odczynniki fotograficzne
- środki ochrony roślin I i II klasy toksyczności (bardzo toksyczne i toksyczne) np. herbicydy i insektycydy
- puste pojemniki ciśnieniowe
- sorbenty
- elementy zawierające rtęć
- płyny hamulcowe
- chemikalia laboratoryjne i analityczne
- smoły i produkty smołowe
- rozpuszczalniki
- kwasy i alkalia
- detergenty [2,3,5]

2. Bioremediacja

Szerzący się stopień zanieczyszczenia wód i gleby, obejmujący coraz szersze obszary postawił świat przed poważnym problemem poszukiwania najbardziej skutecznych i wydajnych metod neutralizacji

lub usuwania zanieczyszczeń ze środowiska. Wśród wielu metod najbardziej obiecującą stała się metoda bioremediacji [6].

Początek opracowania tej technologii sięga badań prowadzonych przez USGS (United States Geological Survey), które wykazały obecność w glebie mikroorganizmów o specyficznej aktywności przekształcania toksycznych substancji ropopochodnych. Zaobserwowano wtedy możliwość zwiększenia wydajności biotransformacji poprzez dodanie odpowiednich stymulatorów wzrostu w postaci substancji odżywczych. Proces bioremediacji po raz pierwszy został w praktyce zastosowany w 1992 roku i na testowanym obszarze osiągnął obiecujący 75% spadek poziomu zanieczyszczeń w ciągu 1 roku [6]. Obecnie bioremediacja jest techniką powszechnie stosowaną na obszarach skażonych o różnej koncentracji zanieczyszczeń [8]. Oparta jest na procesach biologicznych, które eliminują lub przekształcają zanieczyszczenia do mniej toksycznych lub potencjalnie użytecznych substancji. Reakcje katalizowane są przez populacje mikroorganizmów i roślin w ekosystemach glebowych lub wodnych. Podstawę procesu stanowią reakcje oksydacyjne, reduktywne i hydrolityczne, przeprowadzane przez mikroby oraz mechanizmy asocjacji u populacji roślinnych i mikroorganizmów [9]. Tempo procesu bioremediacji może obejmować okres od kilku miesięcy do lat, co zależy od wielu czynników. Na wydłużenie tego okresu ma wpływ wysokie stężenie zanieczyszczeń, lokalizacja zanieczyszczeń w trudno dostępnych miejscach, zbyt duży i głęboki obszar występowania zanieczyszczenia [7].

Na stopień zanieczyszczenia gleby, wód i powietrza mają wpływ wzajemnie powiązane właściwości odpadów (struktura chemiczna czy rozpuszczalność) oraz czynniki środowiskowe (opady, temperatura,

promieniowanie ultrafioletowe, wilgotność itp.). Wymienione czynniki regulują podatność na reakcje transformacji katalizowane przez populacje mikroorganizmów. O losie substancji chemicznych w glebie decyduje rodzaj szaty roślinnej, odpowiedzialnej za absorpcję i translokację, przyczyniających się bezpośrednio do usunięcia odpadów z gleby lub wody. Bioremediacja substancji chemicznych w glebie uzależniona jest od aktywności mikroorganizmów glebowych lub asocjacji z systemem korzeniowym. Molekularne zmiany katalizowane przez mikroorganizmy obejmują procesy oksydacji, redukcji, hydrolizy, deestryfikacji itp. [9].

2.1. Typy i strategie bioremediacji

Technologia bioremediacji podzielona jest na 3 typy. Pierwszy typ stanowi podstawowa bioremediacja naturalna, wykorzystująca wyłącznie naturalne mikroorganizmy, rodzime dla oczyszczanego terenu. Nie wymaga ona żadnej ingerencji ze strony człowieka, który skupia się jedynie na stałym monitoringu postępu naturalnych procesów oczyszczania. W przypadku, gdy proces bioremediacji naturalnej nie osiąga pożądanych efektów, stosowane są pozostałe dwa typy bioremediacji, tzn. biostymulacja i bioaugmentacja. Biostymulacja jest metodą stymulacji wzrostu i aktywności mikroorganizmów naturalnych poprzez modyfikację pewnych parametrów środowiska, szczególnie napowietrzenie oraz suplementację odpowiednimi składnikami odżywczymi. Gdy jednak rodzime szczepy nie wykazują odpowiednich właściwości degradacyjnych stosowana jest metoda bioaugmentacji, polegająca na zaszczerpieniu podłoża odpowiednio wyselekcjonowanymi szczepami bioremediacyjnymi [10, 28].

Proces bioremediacji prowadzony może być z zastosowaniem 2 strategii: *in situ*, stosowanej na obszarze objętym procesami oczyszczania oraz *ex situ*, związanej z koniecznością przeniesienia zanieczyszczonego podłoża do specjalnie przystosowanego miejsca. Strategia *in situ* stanowi korzystniejszą i bardziej cenioną metodą ze względu na niższe koszty oraz mniej skomplikowane procedury jej zastosowania. Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia ze względu na niską stabilność warunków środowiska oraz trudności w utrzymywaniu optymalnych dla procesu parametrów. Poza tym częstą barierą stanowi utrudniona dyfuzja składników odżywczych i tlenu w całej objętości skażonej gleby [10]. W przeciwieństwie do strategii *in situ*, *ex situ* wymaga specjalnie przygotowanego stanowiska technologicznego, oraz konieczności przetransportowania fragmentu skażonego terenu z miejsca macierzytego do miejsca, gdzie poddany zostanie procesom bioremediacyjnym. Czynności te pociągają za sobą znaczne koszty. Są one jednak rekompensowane przez stabilność środowiska oraz możliwość łatwej manipulacji dowolnymi parametrami procesu. Umożliwia to osiągnięcie wysokiego tempa i skuteczności procesu oczyszczania. Metodami stosowanymi w ramach strategii *ex situ* jest landfarming, kompostowanie, wykorzystanie biostosów oraz bioreaktorów [10].

2.2. Czynniki procesu bioremediacji

Efektywność bioremediacji zależy od odpowiednich warunków środowiskowych pozwalających mikroorganizmom na wzrost i aktywność. Kontrola i optymalizacja warunków procesu oraz zwiększenie tempa jego przebiegu, wiąże się z koniecznością manipulacji

parametrami środowiskowymi składającymi się na skomplikowany system wielu czynników bioremediacji. Obejmują one przede wszystkim:

a) Czynniki środowiskowe

- rodzaj gleby
- temperatura
- pH
- dostępność tlenu lub innych akceptorów elektronów
- dostępność składników odżywczych

b) Rodzaj populacji drobnoustrojów zdolnych do degradacji odpadów

c) Dostępność zanieczyszczeń w skażonym środowisku

Optymalne warunki dla procesu nie zawsze mogą być osiągnięte in situ, na co wpływ zbyt niska temperatura dla aktywności mikrobów lub też zbyt wysoka gęstość gleby uniemożliwiająca utrzymanie jednakowych parametrów w całej objętości oczyszczanego obszaru [7].

2.2.1. Czynniki środowiskowe

Parametry takie jak dostępność odpowiednich składników odżywczych, temperatura, pH, napowietrzenie oraz rodzaj podłoża są istotne do wzrostu określonych mikroorganizmów oraz osiągnięcia przez nie odpowiedniej aktywności metabolicznej warunkującej właściwy przebieg procesu oczyszczania środowiska [10].

Naturalne środowisko na obszarze podlegającym oczyszczeniu często nie dostarcza optymalnej ilości wymaganych substancji odżywczych i tlenu, w związku z tym często практикуje się użycie metody biostymulacji. Polega ona na modyfikacji środowiska poprzez suplementację odpowiednią pożywką oraz tlenem. Najistotniejszymi elementami budulcowymi mikroorganizmów potrzebne w największych

ilościach jest węgiel, wodór, azot, tlen oraz fosfor. Przyjmuje się, że wymagany stosunek C:N:P powinien wynosić 100:10:1. Inne pierwiastki jak siarka, potas, sód, wapń, magnez, chlor czy żelazo są wymagane w mniejszych stężeniach ale stanowią niezbędne elementy gwarantujące właściwy przebieg procesów metabolicznych. Systemy bioremediacyjne działają zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, zależnie od rozkładanych zanieczyszczeń i użytych w tym celu rodzaju mikroorganizmów. Optymalna ilość tlenu dla mikroorganizmów aerobowych wynosi $> 0,2 \text{ mgO}_2/\text{l}$, czyli 10% minimalnej przestrzeni powietrznej gleby wypełnionej powietrzem, natomiast dla organizmów anaerobowych wartość ta nie przekracza 1% [10, 11].

Czynnikiem powiązanim z zawartością składników odżywczych jest pH, będący miarą kwasowości lub zasadowości wody. pH gleby wpływa na dostępność pierwiastków, a optymalna jego wartość dla procesu bioremediacji mieści się w granicach 5,5-8,5 [12].

Mimo iż mikroorganizmy przeprowadzające proces bioremediacji izolowane są z ekstremalnych warunków, to wartości wymagane do optymalnej aktywności degradacyjnej obejmują znacznie węższe zakresy (Tabela 2).

Tabela 2. Wartości wybranych parametrów wymaganych dla wzrostu i aktywności mikroorganizmów bioremediacyjnych

PARAMETRY	WYMAGANE WARTOŚCI
Temperatura	15-45 °C
pH	5,5-8,5
Wilgotność	25-28%
Zawartość tlenu	Aeroby >0,2 mgO ₂ /l
Typ gleby	Niska zawartość gliny lub iłu
Zawartość metali ciężkich	2000 ppm
Zawartość składników odżywczych	C:N:P=100:10:1

Źródło: Opracowanie własne: Vidali M.: *Bioremediation. An overview*, Pure and Applied Chemistry, nr 7, 2001, str.1163-1172

Optymalne warunki dla procesu nie zawsze mogą być osiągnięte in situ, na co wpływ zbyt niska temperatura dla aktywności mikrobów lub też zbyt wysoka gęstość gleby uniemożliwiająca utrzymanie jednakowych parametrów w całej objętości oczyszczanego obszaru [7]. .

2.2.2. Dostępność zanieczyszczeń

Warunkiem efektywnego przebiegu procesu bioremediacji jest możliwość bezpośredniego kontaktu mikrobów ze znajdującym się w środowisku zanieczyszczeniami. Problemem w utrzymaniu tego parametru stwarza nierównomierny rozkład mikroorganizmów i zanieczyszczeń w środowisku (dotyczy to szczególnie gleby) [10]. Dodatkową barierę stwarza lokalizacja zanieczyszczeń w trudno dostępnych miejscach (skały, szczeliny, pory glebowe itd.) [7]. Wiele mikroorganizmów ma możliwość poruszania się i wykazuje odpowiedź chemotaktyczną, przemieszczając się w kierunku wysokiego stężenia zanieczyszczeń. Grzyby nitkowate zmniejszają dystans pomiędzy

grzybnia a źródłem zanieczyszczenia poprzez ukierunkowany wzrost filamentów [10].

2.2.3. Mikroorganizmy bioremediacyjne

Mikroorganizmy izolowane ze środowisk zanieczyszczonych odznaczają się znacznym przystosowaniem do warunków ekstremalnych obejmujących skrajne temperatury, zróżnicowany stopień wilgotności, warunki silnego napowietrzenia lub niedoboru tlenu, wysokie zasolenie czy skrajne wartości pH. Wykazują natomiast wysokie wymagania w stosunku do źródła węgla i energii. Mikroorganizmy bioremediacyjne należą do bakterii i promieniowców (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Berijenickia*, *Flavobacterium*, *Nitrosomonas*, *Pseudomona*, *Serratia*, *Xanthobacter*, *Nocardia*, *Actinobacter*, *Algalicens*, *Arthrobacter*) oraz grzybów (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*). Poszczególne mikroorganizmy nie mogą samodzielnie mineralizować najbardziej niebezpiecznych związków, dlatego współdziałają one w układach synergistycznych, opartych o kometabolizm. Większość systemów bioremediacyjnych działa w warunkach tlenowych, ale obecnych jest też wiele mikroorganizmów anaerobowych [28].

3. Zastosowanie grzybów w bioremediacji

W ekosystemie grzyby stanowią najważniejszą grupę reducentów, powodujących rozkład polimerów roślinnych. Posiadają one zdolność do mineralizacji, zatrzymywania i przechowywania jonów oraz akumulacji materiałów toksycznych. Szerokie rozpowszechnienie grzybów w środowisku, przyczyniło się do przystosowania się ich do wielu czynników niekorzystnych, obejmujących również szeroką

gamę zanieczyszczeń. Rezultatem tych przystosowań, było wykształcenie się u tych organizmów unikalnych właściwości bioremediacyjnych [9]. Pomimo obserwacji występowania dużej liczby różnych gatunków grzybów w miejscach skażonych, początkowo nie wiązano tego zjawiska z ich właściwościami degradacyjnymi, przez co niewiele uwagi poświęcano tej grupie jako potencjalnym organizmom bioremediacyjnym [13].

Obecnie rola grzybów w oczyszczaniu środowiska jest nieoceniona. Za ich wykorzystaniem przemawia wiele cech, które odpowiadają za wysoką wydajność procesów degradacyjnych w warunkach laboratoryjnych jak i w warunkach *in situ*. Wiele badań prowadzonych w ostatnich latach skupia się w dużej mierze nad wykorzystaniem grzybów strzępkowych (nitkowatych). Wykazują one niską wrażliwość na zmiany środowiskowe, jak zmiana natlenienie, pH, temperatury i składników odżywczych. Grzyby te zdolne są do wzrostu i rozwoju w środowisku o wysokim zasoleniu, co jest istotną właściwością w procesach oczyszczania środowiska, gdyż wiele odpadów generowanych przez działalność przemysłową posiada wysoki poziom zasolenia [15].

Jedną z najistotniejszych cech grzybów jest obecność kompleksów enzymatycznych o niskiej specyficzności substratowej i silnych właściwościach utleniających, umożliwiających utylizację związków trudno degradowanych. Do enzymów tych należą oksygenazy, lakkazy, peroksydazy oraz hydrolazy (lipazy, celulazy, proteazy), odpowiedzialne za rozkład szerokiej gamy związków organicznych. Wykorzystanie enzymów zewnątrzkomórkowych stwarza konieczność utrzymania

w oczyszczanym środowisku warunków sprzyjającym optymalnej aktywności enzymatycznej [26].

Obiecujące wyniki daje technika bioremediacji oparta o wykorzystanie grzybów strzępkowych z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*. Gatunki tych rodzajów są organizmami kosmopolitycznymi, szeroko rozpowszechnionymi w rozmaitych środowiskach. Izolowane są z siedlisk lądowych, osadów dennych, powierzchni wód, gdzie odgrywają istotną rolę w naturalnych procesach bioremediacyjnych [14]. Ich szczególna rola w procesach oczyszczanie środowiska polega na degradacji ksenobiotyków, czyli związków niesyntetyzowanych na drodze biochemicznej, pochodzenia antropogenicznego, nie występujących naturalnie w środowisku. Związki te są wysoce odporne na biodegradację a należą do nich wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, związki fenolowe czy polichlorowane bifenyle. Grzyby strzępkowe wykazują również zdolność do usuwania metali ciężkich [14,16]

3.1. Metale ciężkie

Zanieczyszczenia środowiska przez metale ciężkie są jednym z najpoważniejszych problemów ostatnich lat, ze względu na ich toksyczność i rozpowszechnienie. Do zwiększenia koncentracji metali w środowisku przyczyniają się procesy naturalne, związane z obiegiem metali w przyrodzie, takie jak wietrzenie, aktywność biologiczna oraz aktywność wulkaniczna. Obok źródeł naturalnych znacznie większy udział mają źródła antropogeniczne związane z działalnością człowieka, wynikające z gwałtownego rozwoju cywilizacji (rozwój przemysłu, intensyfikacja rolnictwa, nasilenie komunikacji, ścieki i odpady

komunalne) [17]. Metale ciężkie nie podlegają przemianom w procesach chemicznych i fizycznych, przez co pozostają w środowisku jeszcze przez wiele lat. Istnieje mnóstwo technik usuwania metali ciężkich ze środowiska, np. precypitacja chemiczna, oksydacja, redukcja, filtracja, wymiana jonowa czy ewaporacja, które jednak są mało opłacalne i nieefektywne przy koncentracji metali mniejszej niż 100 mg/l [18]. Poza tym w wielu przypadkach mogą prowadzić do powstawania toksycznych produktów. Dlatego tak ważna jest w rozwiązaniu tego problemu technika bioremediacji, wykorzystująca mikroorganizmy, ponieważ zapewnia ona zredukowanie ilości metali ciężkich do bezpiecznego poziomu, w sposób przyjazny dla środowiska i nie generujący znacznych kosztów [14]. Wykorzystanie w tym celu grzybów strzępkowych jest stosunkowo młodym pomysłem. Za takim rozwiązaniem przemawia wiele korzystnych właściwości tych organizmów, m.in. wysoka tolerancja na obecność metali oraz większa w porównaniu z bakteriami, powierzchnia styku komórek z otoczeniem, zwiększająca szybkość procesu [19]. Grzyby radzą sobie ze stresem jakim jest duże stężenie metali ciężkich dzięki specyficznym adaptacjom, polegających na czasowych zmianach w rozwoju lub właściwościach fizjologicznych [20]. Oczyszczanie środowiska z metali ciężkich przez grzyby odbywa się na drodze trzech podstawowych mechanizmów: biosorpcji jonów metali na powierzchni komórek grzybów, wewnątrzkomórkowym wychwycie jonów metali oraz transformacji chemicznej [14]. Wychwyt jonów metali ciężkich ze środowiska przez grzyby, możliwe jest dzięki obecności ścian komórkowej bogatej w polimery cukrowe (głukan, chityna, mannan), które pełnią funkcję ligandów wiążących jony. *Penicillium sp.* I *Aspergillus sp.* jako biosorbenty mogą być wykorzystywane zarówno

w postaci żywej, aktywnej biomasy jak i komórek martwych. Największy udział w procesach bioakumulacji jonów metali ma wiele gatunków z rodzaju *Penicillium* (Tabela 3) [16].

Tabela 3: Wybrane gatunki rodzaju *Penicillium* i wykaz absorbowanych przez jonów metali ciężkich

BIOSORBENT	METAL CIĘŻKI
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Zn(II), Pb(II), Cu(II), U(VI), Th(IV)
<i>Penicillium italicum</i>	Cu(II), Me(II), Fe(III), Ni(II), Co(II)
<i>Penicillium canescens</i>	Pb(II), Cr(VI), As(III), Hg(II), Cd(II)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Zn(II), Pb(II), Cd(II)
<i>Penicillium spinulosum</i>	Cu(II), Zn(II)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Cr(VI)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Cu(II)
<i>Penicillium digitatum</i>	Zn(II)

Źródło: Opracowanie własne na podstawie: Mohand Rao G.J. i in.: *Treatment and utilization of wood-hydrolysate wastes*, Biochemical Journal, nr 128, 1972, str. 37-38

Obok rodzaju *Penicillium*, dużą zdolność do usuwania metali ze środowiska posiadają grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Największe zainteresowanie w tej dziedzinie wzbudza grzyb *A. niger*. Badania wykazały zdolność wzrostu tego gatunku na podłożach o wysokim stężeniu miedzi i cynku. *A. niger* usuwa jony metali z otoczenia na drodze adsorpcji przez składniki ściany komórkowej lub poprzez tworzenie kompleksów metali z kwasami m.in. z kwasem cytrynowym oraz glukonowym [22].

3.2. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) stanowią grupę związków organicznych o właściwościach hydrofobowych. Powstają one jako produkty uboczne procesów spalania niecałkowitego substancji organicznych i uwalniane są w wyniku naturalnych procesów (aktywność wulkaniczna i pożary lasów) lub działalności antropogenicznej (m.in. przemysł ciężki, spalanie paliw kopalnianych, produkcja asfaltu itd.). Struktura WWA oparta jest na skondensowanych pierścieniach aromatycznych bez obecności heteroatomów lub podstawników. Posiadają one silne właściwości genotoksyczne, mutagenne i kancerogenne [1].

Grzyby nie asymilują WWA jako jedyne źródła węgla i energii. Do detoksykacji wymagają obecności dodatkowego substratu np. glukozy. Dodatek tego cukru do podłoża wzrostu *Penicillium janthinellum*, powoduje wzrost tempa degradacji pirenu. WWA są substancjami hydrofobowymi. Niska rozpuszczalność w roztworach wodnych, powoduje ograniczenie dostępności tych związków, co spowalnia tempo ich utylizacji. Problem rozwiązują odpowiednie surfaktanty, które rozpuszczają cząsteczki WWA, tym samym zwiększając ich stężenie w fazie wodnej. Zwiększenie poziomu degradacji węglowodorów aromatycznych tą metodą stwierdzono m.in. u *P. chrysogenum*, gdzie po dodaniu Tween 80 odnotowano niemal 40% wzrost degradacji fluorenu. Degradacja WWA przez grzyby nitkowate odbywa się za pośrednictwem zewnątrzkomórkowych enzymów ligninolitycznych jak i wewnątrzkomórkowej monooksygenazy cytochromu P450. Oba te szlaki prowadzą do powstania chinonu jako

głównego produktu utlenienia, który wykazuje większą rozpuszczalność i reaktywność niż WWA [14].

Rodzaj *Aspergillus* cechują duże możliwości degradacji zarówno nisko (2-3 pierścieniowe) jak i wysokocząsteczkowych (4-7 pierścieniowe) związków WWA [23]. Dużymi właściwościami degradacyjnymi aromatycznych związków organicznych odznacza się gatunek *Aspergillus fumigatus* [24].

3.3. Fenol i pochodne

Fenol jest aromatycznym związkiem organicznym, który razem ze swoimi pochodnymi jest szeroko rozpowszechniony w środowisku w postaci zanieczyszczeń obecnych w ściekach przemysłowych. Fenol wykazuje duże właściwości toksyczne, powodując podrażnienie błon śluzowych i dróg oddechowych. Jest substancją żrącą, przez co często powoduje zatrucia i oparzenia. Chlorowcopochodne fenolu są substancjami zanieczyszczającymi glebę, wodę i powietrze. Szczególnie niebezpieczny jest pentachlorofenol, którego toksyczność w stosunku do organizmów żywych, oparta jest na inhibicji procesu fosforylacji oksydacyjnej [14].

W celu usunięcia fenoli i jego pochodnych ze środowiska stosowane są metody chemiczne i fizyczne, obejmujące ekstrakcję rozpuszczalnikami, zastosowanie membran, adsorpcja na węglu aktywnym czy oksydacja elektrochemiczna. Procesy te jednak są dosyć kosztowne, mogą prowadzić do powstawania toksycznych produktów wtórnych i powodować dość niewielką mineralizację. Dlatego dobrą alternatywą, jak w przypadku bioremediacji metali ciężkich i WWA, stanowi zastosowanie degradacji biologicznej. W metabolizowaniu tych

związków grzyby odgrywają główną rolę. Kilka szczepów z rodzaju *Penicillium* ma zdolność do przekształcania fenoli w produkty mniej mutagenne. Fenol w tym przypadku stanowi jedyne źródło węgla i energii, a jego katabolizm prowadzi do wytworzenia katecholu, hydrochinonu i kwasu mukonowego. Do mineralizacji fenolu wykorzystywane są przede wszystkim gatunki *P. frequentans*, *P. simplicissimum* oraz *P. chrysogenum* (Tabela 4). *P. simplicissimum* zdolny jest również do degradacji 3-chlorofenolu, 4-chlorofenolu i 4-bromofenolu w obecności fenolu. 3-chlorofenol transformowany jest do chlorohydrochinonu, 4-chlorokatecholu, 4-chloro-1,2,3-trihydroksybenzu oraz 5-chloro-1,2,3-trihydroksybenzu. Z kolei drugi z degradowanych związków, 4-chlorofenol ulega całkowitemu zmetabolizowaniu z jednym produktem pośrednim w postaci 4-chlorokatecholu. Za degradację chlorofenoli odpowiada również szczep *P. frequentans*. Gatunek ten hodowany w obecności fenolu, wykazuje zdolność metabolizowania monochlorofenoli z wytworzeniem związków pośrednich w postaci odpowiednich katecholi i kwasów mukonowych [14].

Tabela 4. Przykład związków fenolowych degradowanych przez wybrane gatunki grzybów z rodzaju *Penicillium*

GATUNEK GRZYBA	DEGRADOWANY ZWIĄZEK
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Fenol,
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Fenol, 3,4-chlorofenol, 2,3,4-fluorofenol, 4-bromofenol
<i>Penicillium frequentans</i>	2,3,4-chlorofenol, 2,3,4-fluorofenol, 3,4-dichlorofenol, 2,4-dichlorofenol

Źródło: Leitão A.L.: *Potential of Penicillium Species in the Bioremediation Field*, International Journal of Environmental Research and Public Health, nr 4, 2009, str. 1393–1417

Najbardziej wydajny w procesie degradacji fenolu jest *A. niger*, zdolny do wykorzystania go jako jedyne źródła węgla i energii. Pierścień benzenu w cząsteczce fenolu ulega dehydroksylacji do pochodnej katecholu, a następnie ulega otwarciu przez meta-utlenienie. Grzyb ten wykazuje wysoką aktywność w postaci zimmobilizowanej na przenośniku z alginianu wapnia. Metoda stwarza perspektywę w szerszym wykorzystaniu do biodegradacji fenolu i związków pokrewnych w ściekach o wysokiej koncentracji tych związków. Umożliwia zmniejszenie czasu redukcji, zwiększenie stabilności komórek oraz pozwala na uniknięcie etapu separacji biomasy od cieczy [25].

4. Podsumowanie

Bioremediacja stanowi metodę biotechnologiczną, z którą inżynierowie środowiska wiążą ogromne nadzieje jako nieocenione wsparcie w walce z stale rozprzestrzeniającym się skażeniem środowiska ksenobiotykami, różnymi substancjami ropopochodnymi czy metalami ciężkimi. W ochronie środowiska stawiana jest przed wszelkimi metodami chemicznymi czy fizycznymi, gdyż w żaden sposób nie wpływa na zmianę składu i właściwości biosfery. Ponieważ wspiera ona i stymuluje naturalnie występujące mikroorganizmy oraz ich procesy metaboliczne, stanowi metodę ekologiczną i całkowicie bezpieczną. Zastosowanie grzybów strzępkowych z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*, które pełnią dużą rolę w oczyszczaniu środowiska, jest metodą dającą obiecujące perspektywy na szersze zastosowania. W celu zwiększenia skuteczności ich działania prowadzone są szeroko zakrojone badania nad lepszym poznaniem metabolizmu i zrozumienia przebiegu, istotnych dla

bioremediacji, szlaków enzymatycznych. Duże znaczenie w badaniach laboratoryjnych ma inżynieria genetyczna, która zajmuje się manipulacją genów, w celu otrzymania ulepszonych szczepów o ściśle określonych cechach. Przed naukowcami stoi jednak wciąż wiele problemów, które czynią technologię bioremediacji z wykorzystaniem grzybów (ale też innych mikroorganizmów), metodę wciąż niedoskonałą. Jednym z nich jest m.in. niezgodność wyników laboratoryjnych z wynikami otrzymanymi w praktycznym zastosowaniu poszczególnych szczepów. Ta i inne przeszkody wciąż wymagają rozwiązania na drodze wieloletnich badań, ale nie przekreślają nadziei związanych z mikoremediacją jako skuteczną bronią w walce o środowisko czyste, nieskażone i przyjazne dla organizmów żywych.

Literatura:

1. <http://www.agnet.org/library.php>, [dostęp: 18.02.2016r].
2. Introduction to the National Pretreatment Program, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC (2011) EPA-833-B-11-001. pp. 1-1, 1-2.
3. http://www.safewater.org/PDFS/resourcesknowthefacts/Cleaning_Up_Pollution.pdf, [dostęp: 19.02.2016r].
4. <http://www.theworldcounts.com>, [dostęp: 18.02.2016r].
5. <http://eko-logis.com.pl>. [dostęp: 18.02.2016r].
6. <http://pubs.usgs.gov/fs/1995/0054/report.pdf>, [dostęp: 20.02.2016r].
7. https://clu-in.org/download/Citizens/a_citizens_guide_to_bioremediation.pdf, [20.02.2016r].

8. Turlough F.G.: *The differential removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from soil during bioremediation*, Environmental Science and Pollution Research, nr 7, 2000, str. 19-26.
9. Singh V.P., Stapleton, Jr. R.D.: *Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection*. Wyd. Elsevier Science, Amsterdam, 2002, str. 1-23.
10. Vidali M.: *Bioremediation. An overview*, Pure and Applied Chemistry, nr 7, 2001, str.1163-1172.
11. Kołwzan B. i in.: *Podstawy Mikrobiologii w Ochronie Środowiska*. Wyd. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2005, str. 1-39.
12. [http://www.deq.state.ms.us/MDEQ.nsf/0/EDAFD869AB77B3B386256D47005C3109/\\$file/Bioremediation.pdf](http://www.deq.state.ms.us/MDEQ.nsf/0/EDAFD869AB77B3B386256D47005C3109/$file/Bioremediation.pdf), [dostęp: 26.02.2016r].
13. Sing H.: *Mycoremediation. Fungal Bioremediation*. Wyd. Wiley-Interscience, New Jersey, 2006, str. 16-19.
14. Leitão A.L.: *Potential of Penicillium Species in the Bioremediation Field*, International Journal of Environmental Research and Public Health, nr 4, 2009, str. 1393–1417.
15. Woolard C.R., Irvine R.L.: *Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor*, Water Research, nr 29, 1995, str. 1159–1168.
16. Mohand Rao G.J. i in.: *Treatment and utilization of wood-hydrolysate wastes*, Biochemical Journal, nr 128, 1972, str. 37-38.
17. Wang J., Chen C.: *Biosorbents for heavy metals removal and their future*, Biotechnology Advances, nr 27, 2009, str. 195-226.

18. Mahendra A., Liakopoulou-Kyriakides M.: *Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass*, Environmental Monitoring and Assessment, nr 187, 2015, str. 4173.
19. Fomina M. i in.: *X-ray absorption spectroscopy (XAS) of toxic metal mineral transformations by fungi*, Environmental Microbiology, nr 9, 2007, str. 308–321.
20. Nazareth S., Marbaniang T.: *Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant Penicillium morphotypes*, Journal of Basic Microbiology, nr 38, 2008, str. 363–369.
21. Dixit R. i in.: *Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes*, Sustainability, nr 2, 2015, str. 2189-2212.
22. Price M.C. i in.: *Aspergillus niger absorbs copper and zinc from swine wastewater*, Bioresource Technology, nr 77, 2001, str. 41-49.
23. Haritash A.K., Kaushik C.P.: *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review*, Journal of Hazardous Materials, nr 169, 2009, str. 1-15.
24. Okoro C.C., Amund O.O.: *Biodegradation of Produced Water Hydrocarbons by Aspergillus fumigatus*, Journal of American Science, nr 3, 2010, str. 143-149.
25. Sharma N., Gupta V.C.: *Batch Biodegradation of Phenol of Paper and Pulp Effluent by Aspergillus Niger*, International Journal of Chemical Engineering and Applications, nr 3, 2012, str. 182-186.
26. Karigar C.R., Rao S.S.: *Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review*, Enzyme Research, nr 2011, 2011, str. 1-11.

27. Naik M.G., Duraphe M.D.: *Review paper on- parameters affecting bioremediation*, International Journal of Life Science and Pharma Research, nr 3, 2012, str. 78-80.
28. Singh R. i in.: *Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review*, Proceeding of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, nr 1, 2014, str. 1-6.
29. Kubiak M.S. *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) – ich występowanie w środowisku i w żywności*, Problemy Higieny i Epidemiologii, nr 94, 2013, str. 31-36.

inż. Mateusz Kęsy¹⁾

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Leśny
Instytut Zoologii, Zakład Hodowli Owadów Użytkowych
ul. Wojska Polskiego 82, 60-637 Poznań
¹⁾matkesy@wp.pl

Rola owadów zapylających w ochronie przyrody na przykładzie wiśni karłowatej (*Prunus fruticosa*)

*The role of pollinators in the fight for endangered species of plants
in Poland on the example of dwarf cherry (*Prunus fruticosa*)*

Słowa kluczowe: *owady zapylające, gatunki zagrożone, ochrona środowiska, ochrona przyrody*

Keywords: *pollinating insects, endangered species, environmental protection, nature conservation*

Streszczenie: Owady zapylające stanowią bardzo ważne ogniwo w ekosystemach, których również człowiek jest elementem. Dzięki ich pracy pozyskujemy nie tylko liczniejsze plony ale również pobieramy produkty z pasiek, które stanowią ważne ogniwo naszej diety. Do najważniejszych owadów zapylających zaliczamy pszczoły miodne oraz trzmiele, które warunkują byt wielu roślin i zwierząt. Rośliny w znacznym stopniu korzystają na pracy pszczół, dzięki czemu obserwujemy większe plony z upraw roślin entomofilnych. W odniesieniu do roślin zagrożonych wyginięciem rola zapylaczy przybiera na swoim znaczeniu wyjątkowy charakter. Przyczyniają się one do przetrwania konkretnych gatunków oraz umożliwiają im funkcjonowanie. *Prunus fruticosa* to wiśnia, której byt determinowany jest dwuznacznie przez obecność zapylaczy gdyż za ich pośrednictwem gatunek ma szansę przetrwać ale również krzyżuje się z innymi wiśniami, co prowadzi do mieszania się genów i zmniejszanie się puli czystych gatunkowo osobników na siedliskach. W pracy przedstawiono zagadnienia dotyczące ochrony wiśni karłowatej (*Prunus fruticosa*) oraz metody przeciwdziałania zjawisku mieszania się gatunku z innymi wiśniami. Celem opracowania było przybliżenie biologii gatunku wiśni karłowatej oraz jej relacji z zapylaczami. Kolejnym

celem było stworzenie planu ochrony dla gatunku *Prunus fruticosa* na terenie Polski z uwzględnieniem niekorzystnych zmian zachodzących w środowisku naturalnego występowania wiśni karłowatej. Praca ma wymiar edukacyjny oraz zwiększający świadomość w zakresie metod czynnej ochrony przyrody i jej elementów w Polsce.

1. Wstęp

Wiśnia stepowa *Prunus fruticosa* zwana również wiśnią karłowatą to jedna z wielu roślin, która jest wpisana do Polskiej Czerwonej Księgi i widnieje jako roślina zagrożona wyginięciem. Stanowisk *Prunus fruticosa* w Polsce jest stosunkowo niewiele i tym bardziej należy zabiegać o jej ochronę poprzez wyznaczanie terenów ochronnych. Istotne z punktu widzenia ochrony gatunku są zapylacze, bowiem to ich występowanie warunkuje prawidłowe funkcjonowanie gatunku wiśni karłowatej. *Prunus fruticosa* należy do rodziny *Rosaceae* (rózowate). Tworzy ona zbiór gatunków roślin narażonych na wyginięcie, oraz jest objęta prawnie ochroną ścisłą. W Karpatach polskich gatunek ten wymarł na stanowiskach naturalnych. W wielu miejscach występuje jedynie pod postacią mieszańca z podobną do siebie wiśnią *Prunus cerasus*. Mimo różnic między oboma gatunkami nie zawsze jednoznacznie można określić, z którym z nich mamy akurat do czynienia. Największe trudności występują poza okresem wegetacji gdy rośliny nie posiadają charakterystycznych liści ani owoców.

2. Opis gatunku

Wiśnia stepowa jest gatunkiem pontyjskim. Występuje głównie na terenach nizinnych. W Polsce występuje do wysokości 300 m n.p.m. Jej zasięg obejmuje centralną i wschodnią Europę. W tych miejscach również najlepiej funkcjonuje bartnictwo- hodowla pszczoł w lasach,

w wydzianych przez człowieka dziuplach starych drzew. W Polsce choć bartnictwo dopiero się odbudowuje po dziesiątkach lat kiedy całkowicie zaprzestano tego rzemiosła to jest duża szansa, że dzikie zapylacze będą jeszcze efektywniej pracować na korzyść roślin entomofilnych zagrożonych wyginięciem. Za tym faktem przemawia to, iż najwięcej barci lokalizowanych jest we wschodniej i centralnej części Polski, czyli w miejscach występowania wiśni karłowatej *Prunus fruticosa*. Występuje na obszarach zlokalizowanych poniżej 67 południka, od południowo-zachodniej Syberii do Nadrenii. Zajmuje chętnie strefę stepu i lasostepu na wschodzie i w odpowiadających im, azonalnych zbiorowiskach roślinnych w zachodniej części zasięgu (1-6).

Wiśnia karłowata występuje w Polsce głównie na południowym wschodzie oraz w niewielkim zagęszczeniu również w centralnej części. Swoim zasięgiem obejmuje takie regiony jak: Wyżyna Lubelska, Wyżyny Zachodniowołyńska, Polesie Wołyńskie, Wyżyna Małopolska, Wyżyna Radomska. Czysta forma wiśni karłowatej występuje w Ojcowskim Parku Narodowym. Kilkanaście izolowanych stanowisk gatunku znajduje się na terenie Kotliny Toruńskiej, Równiny Inowrocławskiej, oraz w rejonie Dolska, Bielinka i Grodziska. Można ją również spotkać w Rezerwach Przyrody we południowo-wschodniej części kraju.

Najczęściej zajmuje odsłonięte wzgórza, strome zbocza jarów, wąwozów i krawędzi dolin rzecznych. Występuje również na terenach płaskich wśród ciepłolubnych zarośli z rzędu *Prunetalia*, ciepłolubne zbiorowiska okrajkowe *Origanetalia* oraz termofilne lasy z klasy *Quercetalia pubescentis*.

Zbiorowiska opisywanej wiśni rozwijają się na glebach zasobnych w węglan wapnia, jak rędziny wapienne i kredowe, gliny zwałowe

czy czarnoziemy. Dla zachowania gatunku istotna jest kwasowość gleb, która powinna wynosić pH 5,0-6,5 z niewielkimi odchyleniami.

Prunus fruticosa w czystości genotypu zachowała się w rejonie Gór Pieprzowych koło Sandomierza, w Kątach II, koło Zamościa, w Stawskiej Górze, koło Chełmna oraz w okolicach Dolska, niedaleko Gostynia.

Prunus fruticosa to krzew o wysokości 0,2-1,2m. Gałązki jego są wzniesione, nagie oraz woskowane. Często posiadają one liczne odrośla korzeniowe. Korowina ma barwę popielatą do ciemnowiśniowej. Jej liście są zróżnicowane pod względem budowy. Krótkopędy charakteryzują się występowaniem ogonków o długości 2-10 mm, natomiast blaszki są długości 15-39 mm i 6-17 mm szerokości, najczęściej odwrotnie jajowate. Na szczycie blaszki są tępo zakończone lub zaokrąglone a u podstawy klinowate, błyszczące i jaśniejsze zawsze od spodu, który jest nagi. Brzegi blaszek są drobno, pojedynczo lub podwójnie karbowanoząbkowane. Na brzegu blaszek występują gruczołki. Kwiaty są najczęściej przedślupne, pięciokrotne, o średnicy do 2 cm, o białych płatkach korony na szypułkach od długości 7-38 mm. Kwitnienie następuje w kwietniu i maju, natomiast jej owocowanie przypada na lipiec. Owoce mogą utrzymywać się niekiedy nawet do sierpnia tego samego roku. Nasiona rozsiewane są głównie przez ptaki i to jest jej podstawowy sposób rozmnażania się, może to robić również wegetatywnie poprzez odrośla korzeniowe.

3. Zapyłacze wiśni karłowatej

Zapyłaczami dla *Prunus fruticosy* są głównie pszczoły z błonkoskrzydłe (*Hymenoptera*). W ramach nadrodziny wyodrębnia się

7 rodzin: lepiarkowate, pszczolinkowate, smuklikowate, spójnicowate, miesiarkowate, porobnicowate oraz pszczołowate. Wielu przedstawicieli tej rodziny ma wyjątkowe znaczenie dla człowieka nie tylko z powodu pozyskiwania produktów pszczelich ale również ze względu na zapylenie roślin. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę rodzin:

Lepiarkowate (*Colletidae*)- jedne z bardziej prymitywnych pszczół, które nie posiadają aparatu do przenoszenia pyłku, dlatego transportują go w wolu. Gnieźdzą się one w ziemi lub pustych łodygach roślin. W Polsce występuje 35 przedstawicieli tej rodziny.

Smuklikowate (*Halictidae*)- do niej należy największa liczba pszczół. To aż 102 gatunki na terenie Polski. Samice zakładają duże kolonie gniazd w ziemi, które często przybierają znaczne rozmiary. Pyłek zbierają na włoski zlokalizowane na nogach. Chętnie oblatują rośliny z rodziny baldaszkowatych (*Apiaceae*)

Pszczolinkowate (*Andrenidae*)- to również bardzo liczna grupa pszczół występująca niemal że na wszystkich kontynentach. Najczęściej zakładają gniazda pojedynczo, chociaż nieliczne gatunki gnieźdzą się w koloniach, Samice transportują pyłek przy pomocy specjalnych włosków na goleniach.

Spójnicowate (*Melittidae*)- jedna z mniej licznych rodzin, reprezentowana w Polsce przez 10 gatunków pszczół, gnieźdzących się w ziemi. Latem często tworzą kolonie dużych rozmiarów. Samice zbierają pyłek na włoski porastające golenie ich tylnych nóg.

Miesiarkowate (*Megachilidae*)- jedna z liczniejszych rodzin, licząca 89 przedstawicieli w Polsce. Należą do tej rodziny chociażby murarka ogrodowa (*Osmia rufa*), miesiarka lucernówka (*Megachile rotundata*). Pszczoły te gnieźdzą się w spruchniałym drewnie, pustych

łodygach roślin, szczelinach murów, skał a także w ziemi. Pyłek transportują na szczoteczce gęstych włosków porastających brzuszną stronę ich odwłoka.

Porobnicowate (*Anthophoridae*)- to rodzina reprezentowana w Polsce przez 84 gatunki. Samice zbierają pyłek na szczoteczkę włosków na goleniach tylnych nóg. Ich gniazda lokalizowane są najczęściej w ziemi, spróchniałym drewnie, łodygach roślin lub w szczelinach zabudowań.

Pszczółowate (*Apidae*)- grupa zrzeszająca w Polsce 37 gatunków pszczoł. Charakteryzuje się najwyższym stopniem rozwoju społecznego. Należą do niej: pszczoła miodna (*Apis mellifera*), trzmiel (*Bombus*) oraz trzmielec (*Psithyrus*)-pasożyt gniazdowy trzmiela, który nie buduje własnego gniazda. Transport pyłku następuje przy użyciu koszyczka.

Ostatnia rodzina jest najważniejsza dla ochrony gatunku *Prunus fruticosa* ponieważ jest to grupa najbardziej rozwinięta społecznie. Do rodzaju pszczoła (*Apis*) należą między innymi: Pszczoła miodna (*Apis mellifera*), Pszczoła wschodnia (*Apis cerana*), Pszczoła czerwona (*Apis koschewnikovi*), Pszczoła olbrzymia (*Apis dorasta*), Pszczoła skalista (*Apis laboriosa*), Pszczoła karłowa (*Apis florea*), Pszczoła buszu (*Apis andreniformis*).

W Polsce Krajowe Centrum Hodowli Zwierząt wskazuje na hodowlę trzech podstawowych ras pszczoł: środkowoeuropejską, kraińską oraz kaukaską. Poza nimi w procesie zapylania wiśni karłowatej mogą brać udział dzikie pszczoły.

Szerzej rdzenne, naturalne populacje pszczoły miodnej klasyfikuje się na świecie według czterech głównych gałęzi ewolucyjnych. Pszczoły według klasyfikacji Ruttnera należą do gałęzi ewolucyjnych: A, C, O i M,

z czego populacje polskich pszczół zaliczane są do gałęzi ewolucyjnej M oraz C (rejon styku hybrydyzacji).

Największe zagęszczenie pszczół występuje w środowisku wiejskim, ruderalnych i parkowych, murawach kserotermicznych oraz wśród zadrzewień śródpolnych. Ze względu na okresowe kwitnienie roślin uprawnych zagęszczenie pszczół jest zmienne. Gdy pożytki nie kwitną pszczół jest mniej. Wymagania troficzne zostały najlepiej poznane w polilektycznych gatunkach *Osmia rufa* oraz *Osmia coerulescens*. Pierwsza z nich zbiera najwięcej pyłku ze śliw, grusz i jabłoni natomiast druga preferuje głównie koniczynę białą, koniczynę łąkową, lucernę siewną i komornicę zwyczajną. *Osmia leucomelaena* oblatują chętnie rośliny motylkowe jak: koniczynę białą, koniczynę łąkową, nostrzyk żółty, komornicę zwyczajną i groszek żółty. *Osmia atrocoerulea* preferuje rośliny krzyżowe: rzepak ozimy, rzepę, ognicę i inne. Pszczoły z rodzaju *Megachile* preferują szczególnie motylkowate: koniczyny, lucerny, wyki, komonice i groszek. Głównymi czynnikami mającymi wpływ na bogactwo pszczół w refugiach są zróżnicowane środowiska przejawiające się bogatym składem gatunkowym roślin a także większymi zasobami pokarmowymi. W rolnictwie konwencjonalnym chwasty uznaje się jako rośliny występujące na polach uprawnych wbrew woli rolnika, co ich zdaniem przyczynia się do strat plonu. Podkreśla się konieczność ich usuwania w zasiewach roślin uprawnych. Obecnie coraz częściej jednak mówi się o regulacji lub ograniczeniu zachwaszczenia do takiego poziomu, aby nie powodowało to istotnych spadków plonów. Podejście takie wynika ze wzrostu świadomości wśród społeczeństwa o pozytywnej funkcji chwastów w agrocenozach i jest zgodne z założeniami rolnictwa ekologicznego i zrównoważonego. Wyniki wielu

badzeń wskazują na pozytywny wpływ rolnictwa ekologicznego na różnorodność flory i fauny na gruntach ornym i trwałych użytkach zielonych. W takich gospodarstwach stwierdza się również większą liczbę gatunków rzadkich i zagrożonych wyginięciem. Oznacza to, iż takie gospodarstwa są ich ostoją.

4. Znaczenie pszczół dziko żyjących dla zachowania gatunków zagrożonych wyginięciem

Stałym elementem krajobrazu wsi są pasy muraw wzdłuż dróg polnych, miedze i zadrzewienia śródpolne, które nie są jednak szczególnie doceniane przez rolników. Te miejsca są często narażone na bezpośrednią ingerencję człowieka, poprzez wykaszanie i wypasanie, przeorywanie lub całkowitą likwidację. Ze względu na te działania są to siedliska nietrwałe dla pszczół. Bezpośrednie sąsiedztwo z polami sprawia iż pszczoły są narażone tam na bezpośrednie działanie pestycydów, insektycydy czy mechanizację prac polowych. Mimo tego fakty tereny śródpolne są nadal bardzo atrakcyjne dla pszczół ze względu na korzyści pokarmowe, ponad to drogi polne, zadrzewienia i przydroża stwarzają korzystne warunki do zakładania gniazd przez dzikożyjące *Apoidea*, Takie tereny stanowią środowisko, w którym może zachodzić pełny rozwój pszczół. Znaczenie pszczół w rolnictwie jest bardzo duże, bowiem przyczyniają się one do wzrostu produkcji rolnej. Liczebność owadów w agroekosystemach jest związana ze stabilnością środowiska i nasileniem antropopresji. Mniejsze zagęszczenie pszczół występuje w środowiskach poddanych silnej presji gospodarki człowieka jak np. wsie, drogi czy uprawy jare. Niezaprzeczalnym jest fakt, że wysokość plonów znacznej liczby roślin uprawnych wiąże się z obecnością pszczół.

W strefie umiarkowanej aż 50 gatunków pszczół uczestniczy w zapylaniu roślin uprawnych. Należy do nich znaczna część roślin pastewnych, oleistych ale również drzewa i krzewy owocowe, czy warszywa. Brak zabiegania o pszczoły wśród upraw przyczynia się do błędnego wnioskowania o przyczynach niskiej dochodowości i plenności roślin entomogamicznych. Duży udział pszczół notowany jest głównie na zapylanych roślinach z rodziny motylkowatych, takich jak: lucerna, koniczyna i lespedeca. Również nasiona oleiste odgrywają duże znaczenie w życiu człowieka. Ponad połowa tłuszczu pochodzącego od takich roślin jak: kokosy, bawełna, oliwki, orzeszki ziemne, soja, rzepak czy słonecznik zależy w dużym stopniu od działalności owadów zapylających. Na uprawach polowych największy udział owadów zapylających mają pszczoły miodne i trzmiele. Wśród trzmieli najczęściej spotykanymi są: *Bombus terrestris* (L.), *B. lucorum* (L.) *B. lapidarius* (L.) i *B. muscorum* (L.) Małe zróżnicowanie gatunkowe Apoidea na uprawach ma się natomiast odwrotnie do ich zagęszczenia. Pola charakteryzuje bardzo wysokie zagęszczenie pszczół przy jednocześnie niskim zróżnicowaniu gatunkowym. Poszczególne uprawy różnią się pomiędzy sobą występowaniem zapylaczy Oblot roślin przez pszczoły wiąże się również z innymi korzyściami dla człowieka. W przypadku roślin motylkowych wskutek ich zapylania dochodzi ponad to do zwiększenia żyzności gleb. Rośliny te od dawna uprawiano w celu przyorania, co korzystnie wpływa na wartość użytkową gleby.

W większości przypadków dzikie zapylacze mogą być owadami uzupełniającymi pracę pszczół miodnych. Jednak w przypadku mniej chętnie oblatywanych przez nią roślin dzikie zapylacze są niezbędne, jak np. w przypadku lucerny. Dla tej rośliny duże znaczenie ma pszczoła

samotnicza: miesiarka lucernówka (*Megachile rotundata*), która potrafi skuteczniej zapylacz lucernę aniżeli pszczoła miodna. Innym przykładem są plantacje nasienne koniczyny czerwonej, gdzie najlepszymi zapylaczami są trzmiele ponieważ posiadają odpowiednio długie języczki by móc zapylić roślinę. Te zaś różnią się między sobą znacznie pod względem atrakcyjności dla pszczół. Najważniejsze rośliny pyłkowe dla pszczoły miodnej to przede wszystkim: rzepak, gryka oraz drzewa owocowe- śliwy i grusze. W ostatnim stuleciu zaczęto lepiej poznawać znaczenie roślin uprawnych dla pszczół, co przyczyniło się istotnie do zwiększenia bazy pokarmowej wszystkich pszczół. W efekcie intensyfikacji rolnictwa nastąpiło znaczne uproszczenie płodozmianu, które mogło stanowić potencjalne ubożenie fauny w środowisku rolniczym. Ten okres to również wzrost upraw roślin nektaro- i pyłkodajnych, w których dominuje rzepak. Obecna sytuacja pożytkowa na terenach rolniczych nie jest sprzyjająca dla dzikich zapylaczy ponieważ nie jest stała, lecz okresowa. Ich rozwój i byt jest determinowany przez człowieka i jego działalność, która w dużej mierze obejmuje naturalne siedliska *Apoidea*. Pmiętać należy, że pszczoły mają istotne znaczenie dla człowieka i całego środowiska. Aby zapobiegać negatywnym zjawiskom proponuje się ochronę naturalnych siedlisk *Apoidea*, uprawę roślin entomofilnych jako bazy pożytkowej oraz prowadzenie sztucznego rozmnażania pszczół. Stosować można również introdukcję lub reintrodukcję niektórych populacji pszczół do środowiska rolniczego. Reintrodukowanie gatunków gnieźdzących się w ziemi jest zadaniem trudnym ze względu na uwarunkowania techniczne. Łatwiej jest przeprowadzać takie działania na gatunkach synantropijnych, które swoje siedliska związały z otoczeniem człowieka. Spośród nich liczną

grupę stanowią pszczoły z rodziny *Megachilidae*, które gnieźdzą się chętnie w glinianych ścianach zabudowań wiejskich oraz w trzcinie pokrywającej dachy drewnianych budynków gospodarczych.

5. Zagrożenia dla gatunku

Na siedliskach niezaburzonych tworzy populacje o stosunkowo dużej liczebności. Zanika natomiast wraz z postępującą dewastacją i eliminowaniem naturalnych siedlisk. Sytuacja gatunku nie ulega poprawie od wielu lat pod względem warunków siedliskowych pozwalających na zachowanie gatunku. Niesprzyjające są również warunki florystyczne na siedliskach. Dochodzi tam w dużym stopniu do zarastania siedlisk naturalnego występowania *Prunus fruticosy*.

Do podstawowych zagrożeń możemy zaliczyć między innymi efekt pozornie ciągłej zmienności między *P.fruticosa* i *P.cerasus* jaki wywołują ich mieszańce i formy introgresywne, reprezentowane szczególnie często w zachodniej części zasięgu *P.fruticosa*. Łatwo one tworzą ze sobą płodne pary. Istotnym efektem niekorzystnych zmian dla gatunku jest również zniesienie barier ekologicznych poprzez zaburzenie pierwotnego charakteru zabiorowisk, co umożliwiło rozwój i ekspansję form hybrydogennych. To w miarę upływu czasu doprowadzić może do rozprzestrzenienia się genotypu *P.fruticosa* w genotypie *P.cerasus*.

6. Szanse ochrony

Ochrona gatunku *P.fruticosa* powinna być prowadzona w sposób bardziej skoordynowany i powinien on obejmować wszystkie siedliska, a nie tylko obręb obszaru Natura 2000 oraz obszarów chronionych.

Należy stworzyć sieć siedlisk dla gatunku by ograniczyć rozproszenie gatunku w obrębie siedlisk. Podstawowe działania przedstawiono poniżej:

Efektywniejsza ochrona płatów roślinnych

Wisienka stepowa powinna być chroniona w sposób kompleksowy poprzez ochronę siedlisk na jakich występuje oraz poprzez stworzenie stref buforowych. Teren ochronny oraz strefy okołoochronne powinny być zweryfikowane pod względem występowania *P.cerasus*, które powinny być przeniesione w inne miejsce lub wycięte. Pszczoły potrafią przenosić pyłek na odległość kilku kilometrów co sprawia, że strefa ochronna powinna obejmować teren o zasięgu co najmniej 10 km by zabieg był skuteczny.

Usuwanie wiśni pospolitej (*P.cerasus*)

Eliminacja z otoczenia *P.fruticosa* wiśni pospolitej powinna przypadać na okres kwietnia gdy można rozpoznać osobniki po liściach. Dodatkowo termin ten pozwala na usunięcie roślin z otoczenia gatunku chronionego przed jego kwitnieniem co powoduje brak możliwości krzyżowania się roślin. Działanie powinno być powtarzane corocznie.

Przywracanie wypasu owiec

Przyczyną eliminacji *Prunus fruticosa* ze środowiska jest również duże zachwaszczenie. By temu zapobiegać warto wprowadzać na nowo wypas owiec i innych zwierząt hodowlanych na tereny występowania gatunku. Proces ten powinien być realizowany w sposób ciągły i corocznie powtarzany w okresach odrostu roślinności.

Ochrona dzikich zapylaczy

Prunus fruticosa to roślina, której istnienie jest współzależne z istnieniem zapylaczy. Warto zwrócić szczególną uwagę na działania zmierzające do zachowania populacji dzikożyjących zapylaczy na terenach ubogich w te owady lub ograniczone w ich dostępność. Takie tereny to przede wszystkim lasy, pola uprawne oraz tereny górskie. Warto prowadzić akcję przywracającą chociażby bartnictwo w lasach co będzie prowadzić w sposób bezpośredni do zwiększania się populacji owadów zapylających ale również będzie mogło to wpłynąć na ilość zapylaczy na siedliskach *Prunus fruticosa* gdyż teren, na którym prowadzone są działania przywracające bartnictwo, ale również tereny, gdzie w największym stopniu występują wisnia karłowa to wschodnia część Polski.

Podnoszenia świadomości o wartości gatunków ginących i zagrożonych wyginięciem wśród dzieci, młodzieży, ale również dorosłych.

Prowadzenie zajęć wśród dzieci, ale również pokoleń starszych może mieć duży wpływ na sposób prowadzenia działań ochronnych za kilkanaście/kilkadziesiąt lat gdyż poprzez naukę od najmłodszych lat i uświadamianie społeczeństwa o wadze prowadzonych działań najefektywniej można prowadzić czynną ochronę gatunków roślin, zwierząt ale również walczyć o ich siedliska.

7. Wnioski

1. Czynna ochrona przyrody w odniesieniu do roślin zapylanych przez owady powinna być prowadzona na większych obszarach

z uwzględnieniem minimalizowania występowania roślinności niepożądaney, a szczególnie wiśni pospolitej *P.cerasus*.

2. W celu przeciwdziałania zanikowi gatunku *P.fruticosa* należy wprowadzić wypas zwierząt w miejscach objętych ochroną siedliskową dla gatunku oraz ograniczać zarastanie takich miejsc.
3. Koniecznym elementem w walce o ginący gatunek wiśni jest objęcie monitoringiem zapylaczy w obrębie występowania *P.fruticosa*.
4. Siedliska wiśni karłowatej powinny być monitorowane co roku.
5. Prowadzone powinny być działania mające na celu odbudowę populacji *P.fruticosa* (w warunkach kontrolowanych) w celu zachowania dostępnej puli genotypów i jej skuteczniejszej ochrony.

Literatura:

1. Clapham A. R., Tutin T. G. & Warburg E. F. *Flora ad the British Isles*. Wyd. 2. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 1962
2. De la Rua P., Jaffe R., Dall'olio R., Munoz I., Serrano J.M. *Biodiversity, Conservation and current threats to European honeybees*. Apidologie 2009. str. 263-284.
3. Gromisz M. *Zasoby pszczoły miodnej i ich ochrona*. [w:] Cierzniak T., *Postęp apilogii w Polsce*. Materiały z IV Krajowej Konferencji Apidologicznej. Bydgoszcz, 1997.
4. Hulten E., Fries M. *Atlas of north european vascular plants*. North of the Tropic of Cancer. Koeliz Scientific Books, Konigstein, 1986. str. 499-968.
5. Matuszkiewicz W. *Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski*, PWN, 1982, Warszawa.

6. Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M. *Vascular plants of Poland- a checklist-Polish* Bot. Stud. Guideb. 1995, Ser. 15: 1-303.
7. Oberdorfer E. *Pflanzensociologische Exkursionsflora*. Wyd. 7. Verl. E. Ulmer, Stuttgart. 1994.
8. Pawłowski B. *Alchemilla L., Przywrotnik.- W:W.Szafer, B. Pawłowski, Flora polska. Rośliny naczyniowe polski i ziem ościennych*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Kraków-Warszawa, 1955, str. 148-228.
9. Rutkowski L. *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*, PWN, Warszawa. 1998.
10. Rutkowski L. *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*, PWN, Warszawa, 2004, str. 254.
11. Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer, Berlin, Germany, 1988, s.284.
12. Walters S. M., Pawłowski B. *Alchemilla L., Flora Europaea. 2. Rosaceae to Umbelliferae*, Cambridge Univ. Press. Cambridge. 1968, str. 48-64.
13. Zając A., Zając M. *Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce*. Kraków, 2001, str. 152.
14. *Polska Czerwona Księga* PWN, Kraków, 2001, str.200-210.
15. *Czerwona Księga Karpat, Rośliny naczyniowe*, Kraków. 2008, str. 198.

mgr inż. Magdalena Joka¹⁾, dr inż. Dorota Dec, Anna Maleszewska, Ewelina
Filipiuk, Beata Piekutowska, Katarzyna Polewko
Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Zakład Inżynierii Rolno-Spożywczej i Leśnej
ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok
¹⁾m.joka@pb.edu.pl

Badanie ilości mikroorganizmów w pofermencie biogazowni Ryboły

*Research quantities of microorganisms in the digestate
of Ryboły biogas plant*

Słowa kluczowe: *poferment, fermentacja metanowa, mikrobiologia, nawóz rolniczy*

Keywords: *digestate, methane fermentation, microbiology, agricultural fertilizer*

Streszczenie: W pracy przedstawiono możliwości zagospodarowania produktów ubocznych (zwanych pofermentem) fermentacji metanowej biogazowni rolniczych. Następnie dokonano oceny ilościowej obecnych w pofermencie mikroorganizmów beztlenowych jako wskaźnika intensywności przebiegających procesów biozgazowania oraz przydatności do zastosowania pofermentu jako nawozu rolniczego. Analizę przeprowadzono metodą zalewową na szalkach Petriego oraz metodą posiewu na podłożu płynnym (bulion wzbogacony). Badany materiał pobierano z biogazowni rolniczej w miejscowości Ryboły w odstępach czasowych, wyróżniając poferment jesienny i zimowy. Uzyskane wyniki badań są różnicowane pod względem ilościowym mikroorganizmów.

1. Wstęp

1.1. Fermentacja metanowa

Odkąd w październiku 1776 r. Alessandro Volta zademonstrował, że gaz wydobywający się z osadu dennego pali się i wnioskował, że istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy ilością produkowanego

palnego gazu a ilością materii organicznej, narodził się proces biometanizacji. W 1808 r. Humphrey Davy określił, że w gazach produkowanych podczas fermentacji gnojowicy bydłowej obecny jest metan. Następnie rozwój mikrobiologii jako nauki doprowadził do identyfikacji w latach trzydziestych XX w. bakterii anaerobowych i warunków sprzyjających produkcji metanu [1].

Fermentacja metanowa jest procesem biochemicznym, który jest prowadzony na drodze beztlenowej (anaerobowej) i przebiega w otoczeniu naturalnym bądź sztucznym stworzonym przez człowieka. Głównym produktem fermentacji metanowej jest biogaz (tabela 1). Najważniejszym, ze względów energetycznych, składnikiem biogazu jest bezwonny, łatwopalny i wysokokaloryczny metan CH_4 , który decyduje o jakości uzyskanego biogazu. Ilość uzyskanego metanu podczas fermentacji zależy od utrzymania odpowiednich beztlenowych warunków fermentacji w odpowiednim pH na poziomie 6,5-7,5. W zależności od gatunku stosowanych mikroorganizmów optymalizuje się temperaturę, czas fermentacji oraz obecność katalizatorów i inhibitorów reakcji. Wartość opałowa biogazu waha się w granicach $20-27 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-3}$ i jest niższa w stosunku do gazu ziemnego o wartości opałowej ok. $33 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-3}$ [2, 3, 4]. Energię powstałą na skutek spalania biogazu w silnikach lub turbinach gazowych wykorzystuje się na potrzeby własne instalacji (biogazowi), a jej nadmiar sprzedawany jest do sieci energetycznej. Produktem ubocznym (odpadem) z produkcji biogazu jest pulpa pofermentacyjna tzw. poferment, który znajduje zastosowanie jako wartościowy nawóz rolniczy.

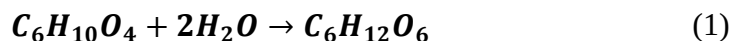
Tabela 1. Skład chemiczny biogazu rolniczego

Związek chemiczny	Metan CH_4	Ditlenek węgla CO_2	Siarkowodór H_2S	Woda H_2O	Wodór H	Tlenek węgla CO	Azot N_2	Tlen O
Udział procentowy %	52-85	14-18	0,08-5,5	2-7	0-5	0-2,1	0,6-7,5	0,1-0,2

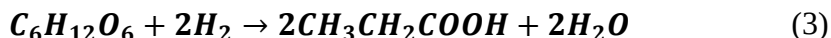
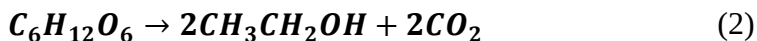
Źródło: Institut für Energetik und Umwelt gmbh. 2005. „Biogaz - produkcja i wykorzystywanie” Leipzig: Interreg; Kaltschmitt, M.; Hartmann, H. “Energie aus Biomasse – Grundlagen, Techniken

Ze względu na obecność suchej masy, wyróżnia się fermentację na sucho i mokro. Proces fermentacji suchej zawiera substraty o 20-40% zawartości s.m. które średnicą nie przekraczają 40mm. Zaletą tej metody jest małe zużycie wody oraz małe zapotrzebowanie ciepła. W przypadku fermentacji na mokro wsad zawiera 15% s.m. Aby możliwe było przepompowywanie, substraty muszą mieć odpowiednią konsystencję. Wadą jest spore zużycie wody oraz energii do ogrzania komory fermentacyjnej oraz większe prawdopodobieństwo tworzenia kożuchów w reaktorze.

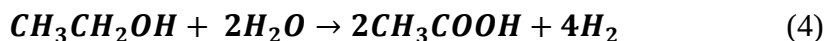
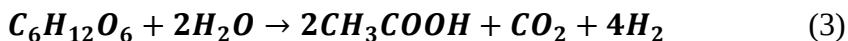
Fermentacja metanowa umownie przebiega w czterech etapach. Nierozpuszczalne związki organiczne takie jak węglowodany, tłuszcze, białka zostają rozłożone do prostych związków rozpuszczalnych w wodzie –aminokwasy, glicerol, cukry proste, kwasy tłuszczowe, zachodzi on przy obecności enzymów takich jak lipazy, proteazy i amylazy [5]:



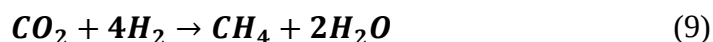
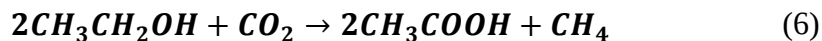
Proces ten nazywa się hydrolizą. Następnym etapem jest kwasogeneza. Następuje tutaj rozkład do substancji prostszych poprzez bakterie beztlenowe. Produktami kwasogenezy są kwasy organiczne, alkohole, aldehydy, dwutlenek węgla i wodór:



Octanogeneza jest przemianą kwasów organicznych i alkoholi do wodoru, dwutlenku węgla i kwasu octowego:



Ostatnim etapem jest tzw. metanogeneza, gdzie z powstałych we wcześniejszym procesie kwasów, wodoru i dwutlenku węgla powstaje metan [6]:



Najważniejszymi parametrami określającymi jakość produkcji biogazu są: udział suchej masy i suchej masy organicznej, ilość składników odżywczych (np. azot *N*, fosfor *P*, potas *K*), zawartość lotnych kwasów tłuszczowych, a także możliwa obecność składników wpływających niekorzystnie na proces fermentacji np. metali ciężkich [7, 13]. Dużym utrudnieniem w prawidłowym funkcjonowaniu biogazowni jest dostarczanie substratów spoza gospodarstwa. Im większa odległość, z której będzie sprowadzana biomasa, tym koszty są coraz większe. Biogazownia Ryboły (woj. podlaskie), z której zostały pobrane próbki pofermentu, dysponuje własnym gospodarstwem co obniża koszty produkcji biogazu. Substratami stosowanymi w biogazowni Ryboły jest w 70% kiszonka z kukurydzy, którą charakteryzuje wysoka wydajność biogazu oraz niskimi kosztami uprawy, 15% obornik świński, 10%

wycierki ziemniaczanej, 5% odchody kurze.

Przygotowanie substratów do biogazowania polega na składowaniu gnojowicy i odpadów organicznych w przeznaczonych do tego pojemnikach. Pojemniki wykonane są z betonu, żelbetu, stali kwasoodpornych lub tworzyw sztucznych. Niekiedy materiały o małym uwodnieniu np. kiszonka kukurydzy są przechowywane pod wiatą (biogazownia Ryboły). W przypadku niejednorodnego materiału stosowane są kraty, sita, wybieraki hydrauliczne lub mechaniczne urządzenia rozdrabniające w celu ujednoludnienia rozmiaru cząstek mieszanki fermentacyjnej. Umiejscowione są one przed ujściem rury doprowadzającej substraty do komory mieszania. Zwiększenie ziarnistości wsadu wpływa na zwiększenie powierzchni cząstek wchodzących w reakcje i tym samym skrócenie czasu fermentacji [7].

Fermentacja metanowa musi przebiegać w odpowiednio dobranych warunkach, które mają istotny wpływ na szybkość i efektywność przebiegu procesu. Jednym z nich jest brak dostępu do tlenu, umożliwiając to fermentatory wykonane ze stali lub zbrojnego betonu. By zapewnić optymalny przebieg procesu fermentacji konieczna jest stała temperatura wewnątrz zbiornika, w zakresie od 4 stopni do 60 stopni Celsjusza (tabela 2). W przedziale od 32 do 38 stopni w fermentacji biorą udział bakterie mezofilne i ten zakres temperaturowy jest najczęściej stosowany. Podczas eksploatacji komór fermentacyjnych, w ciągu doby temperatura może obniżyć lub podwyższyć się jedynie o dwa stopnie Celsjusza. Większa niż podana amplituda temperatur wpływa niekorzystnie na bakterie metanowe, co może skutkować nawet ich obumieraniem oraz gwałtownym spadkiem odczynu, który odpowiada za prawidłowy proces fermentacji metanowej [8].

Tabela 2. Kryteria wpływające na dobór technologii w trakcie projektowania biogazowni

Kryterium	Opcje technologiczne
Liczba etapów procesu technologicznego (rozdzielenie faz fermentacji: hydrolitycznej, acydofilowej, octanogennej, metanogennej)	— Jednoetapowe — Dwuetapowe — Wieloetapowe
Temperatura procesu technologicznego	— Psychrofilowa 10-25 °C (nie stosowana) — Mezofilowa 32-38 °C (stosowane w 85% instalacji) — Termofitowa 52-55 °C
Tryb załadunku wsadu	— Nieciągły (o dużym znaczeniu przy fermentacji suchej) — Quasi-ciągły — Ciągły
Zawartość suchej masy w substratach	— Fermentacja mokra do 12% (bardziej popularna) — Fermentacja sucha od 12% (technologia w fazie rozwoju)

Zródło: „Poradnik pozyskiwania i wykorzystywania biogazu. Rezultaty programu monitoringu biogazowni”
 Institut für Energetik und Umwelt gGmbH 2005; Cebula J. Biogazownie w niewielkich gospodarstwach

Najodpowiedniejszy [9] odczyn w komorze fermentacyjnej wynosi 7 pH. Zasobność w wodę ma duży wpływ na rozwój mikroorganizmów jak również na właściwości i strukturę biomasy [10]. Optymalna zawartość suchej masy wsadu wynosi 12% - 15%. Podczas fermentacji osadów ściekowych wydalaną jest spora ilość wody, którą niezwłocznie należy usunąć. Przeciwnieństwem jest fermentacja odchodów

zwierzęcych, gdzie wydobycie się wody jest nie możliwe [9]. Proces fermentacji metanowej można regulować, inaczej – przyspieszać lub spowalniać poprzez dawkowanie odpowiedniej ilości soli. Jej niewielka ilość działa przyspieszająco, a zbyt duża może spowodować efekt toksyczny, dzieję się tak ponieważ mikroorganizmy beztlenowe (w przeciwieństwie do tlenowych) są podatne na działanie kationów magnezu, potasu, sodu i wapnia. Czas procesu związany jest z temperaturą, ilością oraz częstotliwością doprowadzonego w ciągu doby wsadu. Zależność jest wprost proporcjonalna – im większa temperatura prowadzenia procesu tym załadunek silosów fermentacyjnych musi być większy. Nieodłącznym elementem jest również mieszanie, które hamuje powstawanie kożucha w górnej części zbiornika fermentacyjnego i ułatwia odgazowanie mieszanki fermentacyjnej. Wraz ze wzrostem temperatury należy zwiększyć częstość mieszania. Celem mieszania jest również zagwarantowanie jednorodnego przebiegu procesów fermentacji w obrębie całej objętości komory: mieszane cząstki substancji organicznej są łatwiej dostępne dla bakterii co przyspiesza proces fermentacji. W przypadku niedostatecznego mieszania może dojść do istotnego ograniczenia kontaktu pomiędzy wsadem a bakteriami czego skutkiem jest spowolnienie procesów rozkładu, przeprowadzone zbyt intensywnie może doprowadzić do naruszenia skupisk bakterii i tym samym zatrzymania procesu biologicznego. Obecnie stosowanymi systemami mieszania w zbiornikach fermentacyjnych są w większości mieszadła ślimakowe, łopatkowe (biogazownia Ryboły) lub miksery [7, 11, 12].

Produktem ubocznym w procesie powstawania biogazu jest siarkowodór, piana oraz para wodna. W celu zapobiegania

nagromadzenia piany montowane są chwytacze piany. Resztki osadu usuwane są poprzez filtry drobnoziarniste i gruboziarniste. Dosyć powszechną, stosowaną jako filtr siarkowodoru ze względu na swoje właściwości absorpcyjne (zdolność do pochłaniania substancji gazowych), skałą osadową jest ruda darniowa. Siarkowodor ma właściwości toksyczne i korozyjne (powoduje uszkodzenie komór spalania, łopatek turbin gazowych) oraz pogarsza jakość biogazu. Oprócz zawartości siarki S w mieszaninie biogazu istotnym problemem jest zawartość pary wodnej, która umożliwia tworzenie siarczanów poprzez uwodnienie kwasu siarkowodorowego H_2S do silnie higroskopijnego kwasu siarkowego (VI) H_2SO_4 . Kwas siarkowy (VI) tworzy z metalami alkalicznymi dobrze rozpuszczalne w wodzie sole tzn. siarczany. Konieczne osuszanie biogazu następuje w procesie schładzania, gdzie część pary wodnej ulega kondensacji. Kolejnym krokiem uzdatniania biogazu jest jego odsiarczanie [7,11]. Odpowiednio oczyszczony gaz trafia na filtry ceramiczne, gdzie zostaje usunięty osad (opada na dno filtra), a oczyszczony bezwonny gaz przepływa ku górze.

Reasumując fermentacja metanowa jest procesem dzięki któremu otrzymujemy wysoko wartościowy produkt jakim jest biogaz. Gaz wytwarzany z odpadów ulegających biodegradacji takich jak odpady organiczne, zwierzęce oraz osady ściekowe, wykorzystywany jest do napędzania pojazdów, uzyskiwania energii cieplnej i elektrycznej, a produkt płynny w postaci pofermentu do pozyskania naturalnego nawozu co korzystnie wpływa na funkcjonowanie środowiska (ogranicza emisję gazów cieplarnianych, zapobiega zanieczyszczeniu gleb oraz wód gruntowych) [12, 13].

1.2. Biogazownie rolnicze

Biogazownie są zakładami produkcyjnymi, w których uzyskuje się biogaz do celów energetycznych. Celem biogazowni rolniczych jest przede wszystkim przede wszystkim utylizacja odpadów z produkcji rolno-spożywczej lub oczyszczalni ścieków (np. gnojowica zwierzęca, wysłody buraczane, wycierka ziemniaczana, surowe osady ściekowe). Ogromną zaletą biogazowni jest kontrolowanie emisji biogazu do środowiska. W celu maksymalizacji potencjału energetycznego biogazowni stosuje się różne mieszanki wsadu. Wsad stały powinien zawierać co najmniej 15% suchej masy. Kiszonki i trawy są najczęściej wybieranymi roślinnymi surowcami odnawialnymi. Mimo zbliżonych parametrów wydajności i jakości wytwarzanego biogazu (tabela 3), wśród odpadów pochodzących z produkcji zwierzęcej stosowanych jako wsad do biogazowni przeważa gnojowica, następnie jest obornik bydlęcy, a dalej gnojowica świńska [7, 14, 15].

Tabela 3. Surowce do produkcji biogazu i ich własności energetyczne

Surowce	sm %	smo %	Wydajność biogazu $\text{m}^3 \cdot \text{Mg}^{-1} \text{ smo}$	Zawartość CH_4 % obj.
Nawóz naturalny				
Gnojowica bydlęca	8-11	75-82	200-500	60
Gnojowica świńska	7	75-86	300-700	60-70
Obornik bydlęcy	25	68-76	210-300	60
Obornik świński	20-25	75-80	270-450	60
Obornik kurzy	32	63-80	240-450	60
Produkty uboczne z przemysłu rolno-spożywczego				
Kiszonka kukurydzy	20-35	85-95	450-700	50-55

Żyto (Kiszonka z całych roślin)	3035	92-97	550-680	55
Burak cukrowy	23	90-95	800-860	53-54
Burak pastewny	12	75-85	620-850	53-54
Korzonki buraczane	16	91	643	51
Liście buraczane	16	75-80	550-600	54-55
Kiszonka trawy	25-50	70-95	550-620	54-55
Wysłodziny browarniane	20-27	70-80	580-750	59-60
Pogorzelniany wywar zbożowy	6-8	83-88	430-700	58-65
Świeża pulpa owocowa lub warzywna	13	90	650-750	52-65
Odcieki z przeróbki owoców i warzyw	3,7	70-75	1500-2000	50-60
Melasa	80-90	85-90	360-490	70-75
Wytłoki z owoców	25-45	90-95	590-660	65-70
Odpady z kapusty białej głowiastej	12	93	706	55

Źródło: Zamojski H., Putra J. „Możliwość produkcji biomasy pochodzenia rolniczego w województwie opolskim”, OODR Łosiów 2009; Deublein D., Steinhauser A. “Biogas from waste and renewable resources”, 2008; Oniszk-Popławska A., Zowski M., Wiśniewski G. „Produkcja i wykorzystanie biogazu rolniczego” EC BREC, Warszawa, 2003.

W ciągu ostatnich 10 lat ilość biogazu rolniczego produkowanego w Polsce wzrosła 4 krotnie, jednak jest to nadal niewielka część realnego potencjału krajowego rynku biogazu. Wśród czynników istotnie ograniczających rozwój sektora biogazowni można wymienić m.in. ograniczenia organizacyjne, prawne i ekonomiczne oraz brak odpowiedniego doradztwa technicznego [14]. Województwo podlaskie

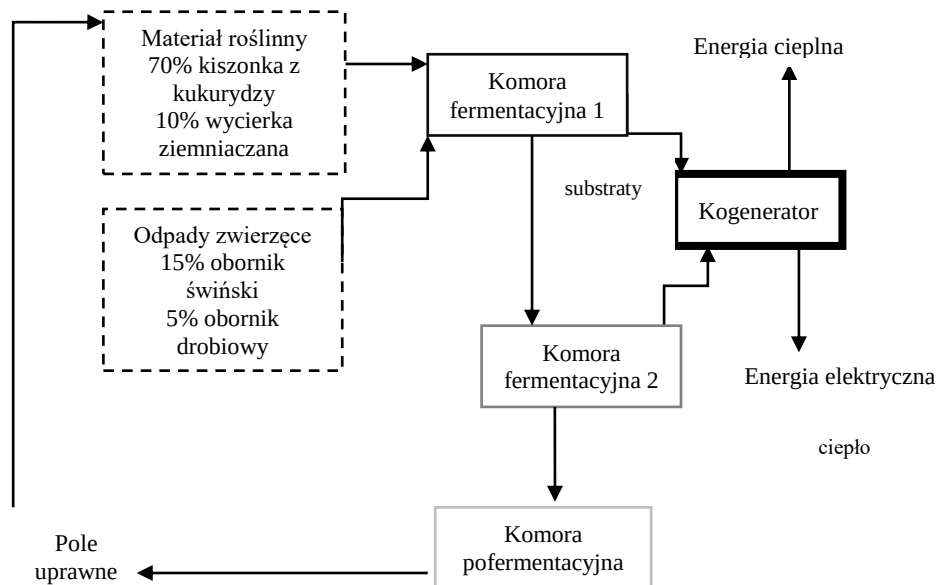
dysponuje dwiema działającymi w skali technicznej biogazowniami. Pierwsza o mocy 1 MW powstała w Rybołach (gmina Zabłudów), druga w Siemiatyczach w obrębie oczyszczalni ścieków (0,2 MW).

W skład kompleksu Biogazowni Ryboły wchodzi zbiornik zasypowy substratu wraz z układem przepompowującym materiał do dwóch komór fermentacyjnych i komory pofermentacyjnej, układ spalania i odsiarczania biogazu. Podstawowe parametry techniczne biogazowni zamieszczone zostały w tabeli 4. Wszystkie trzy zbiorniki pełnią jednocześnie funkcję magazynu biogazu (gaz gromadzi się w przestrzeni nad substratem, pod kopułami wykonanymi z elastycznego materiału). Instalacja biogazowni jest ponadto zaopatrzona w pochodnię awaryjną, która spala nadmiar biogazu, zestaw filtrów węglowych służący do odsiarczania biogazu, trafostację do przekazywania i pomiaru energii elektrycznej do sieci energetycznej oraz agregat prądotwórczy, który zasila całą instalację w przypadku przerw w dostawie prądu [16]. Schemat ideowy Biogazowni Ryboły przedstawiono na rysunku 1.

Tabela 4. Parametry techniczne biogazowni Ryboły

Parametry biogazowni	
Moc biogazowni	1,052 MW
Zbiornik fermentacyjny 2 szt.	średnica – 30 m, wysokość – 6 m
Zbiornik pofermentacyjny 1 szt.	średnica – 32 m, wysokość – 8 m
Kogenerator	2 szt. o mocy: 400 MW i 600 MW
Temperatura procesu	38-43°C
Ilość przepompowywanego substratu między zbiornikami	30 – 35 m ³
Dzienny wsad	42-44 t
Zużycie biogazu do produkcji energii	480m ³ /1MWh
Dzienna produkcja biogazu	11000 – 11600 m ³
Dzienna produkcja energii elektrycznej	23 – 24 MWh

Źródło: Joka M., Szatyłowicz E., Ofman P., Zawartość metali ciężkich w produktach i półproduktach fermentacji metanowej z biogazowni rolniczej Ryboły

**Rysunek 1. Schemat ideowy Biogazowni Ryboły**

Źródło: Joka M., Szatyłowicz E., Ofman P., Zawartość metali ciężkich w produktach i półproduktach fermentacji metanowej z biogazowni rolniczej Ryboły

1.3. Możliwości wykorzystania pofermentu

Pofermentem nazywamy nieprzefermentowane przez bakterie związki organiczne (biomasa) oraz składniki mineralne. Masa pofermentacyjna jest wartościowym produktem ubocznym, którego odpowiednie wykorzystanie może nie tylko nie stwarzać problemów dla biogazowi, ale przynosić jej dodatkowy dochód. Zgodnie z obowiązującym prawem substancja pofermentacyjna może być klasyfikowana jako odpad lub jako produkt uboczny -nawóz organiczny [17].

Tabela 5. Wartość nawozowa pofermentu w zależności od substratów

Substraty	Udział substratów %	Zawartość suchej masy %	Koncentracja składników w pofermencie $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ świeżej masy			
			N ogólny	N- NH_4	P_2O_5	K_2O
Kiszonka z kukurydzy (35% s.m.) + gnojowica bydlęca (8% s.m.)	70 30	9,0	5,8	3,8	2,3	9,1
Kiszonka z kukurydzy (35 % s.m.) + gnojowica świńska (6% s.m.)	40 60	6,3	5,5	3,6	2,6	5,2
Kiszonka z kukurydzy (35% s.m.) + kiszonka GPS z żyta (29,4% s.m.)	80 20	10,9	7,0	4,6	2,8	11,1
Kiszonka z kukurydzy (35% s.m.) + gnojowica świńska (6% s.m.) + ziarno pszenicy (86,6% s.m.)	85 10 5	10,5	7,5	4,9	3,6	10,1

Kiszonka z kukurydzy (35% s.m.)	40					
+ gnojowica bydlęca (8% s.m.)	55					
+ kiszonka z traw (25% s.m.)	5	7,5	5,5	3,6	2,1	8,1
Gnojowica bydlęca (8 % s.m.)	100	5,1	5,0	3,3	1,8	6,5

Źródło: Dohler H., Krotzsch S., 2007: Faustzahlen Biogas, KTBL, Darmstadt.

Możliwości wykorzystania pofermentu jest wiele. W Polsce najczęściej wykorzystywany jest on w rolnictwie bądź utylizowany termicznie. Głównymi czynnikami decydującymi o sposobie wykorzystania pofermentu są jego jakość, lokalne uwarunkowania oraz obowiązujące regulacje prawne. Poferment jako nawóz stosowany jest na użytki zielone, grunty orne pod wszystkie rośliny uprawy polowej (zboża, kukurydza, rzepak, rośliny pastewne i przemysłowe) orientacyjnych dawkach 20-30 m³/ha (oziminy), 30-40 m³/ha (rośliny jare). W rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 1 czerwca 2001 r. w sprawie szczegółowego sposobu stosowania nawozów oraz prowadzenia szkoleń z zakresu ich stosowania (Dz. U. Nr 60, poz. 616), wydanego na podstawie art. 15 ustawy o nawozach i nawożeniu, sprecyzowano zasady nawożenia, także nawozami naturalnymi. Między innymi dotyczą one terminów i sposobu ich stosowania. Przytoczyć tu należy przepis § 2 ust. 4, zgodnie z którym nawozy naturalne powinny być stosowane w okresie od dnia 1 marca do dnia 30 listopada. Zawarty został także wymóg przykrycia lub wymieszania nawozów naturalnych z glebą nie później niż następnego dnia po ich zastosowaniu.

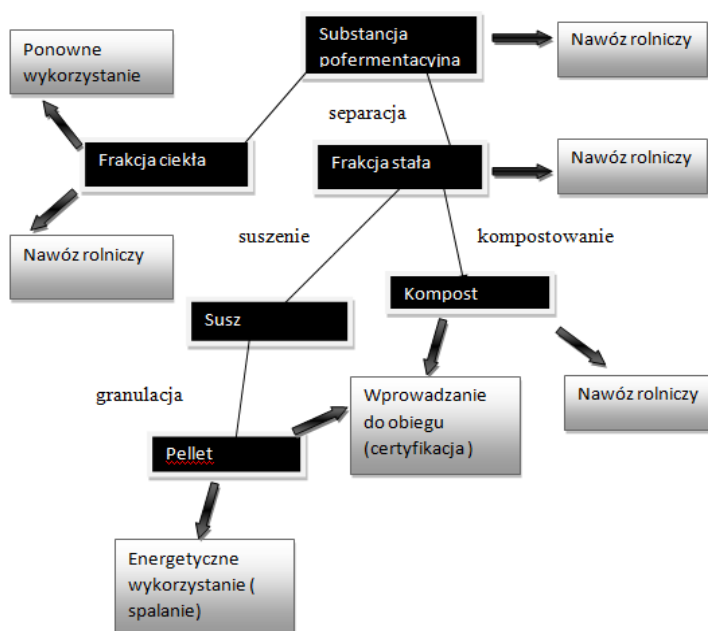
Stosowanie pofermentu wpływa korzystnie na żyzność gleby, dostarczając jej wielu cennych składników mineralnych. Do najczęstszych metod wykorzystania pofermentu w rolnictwie należą:

- Bezpośrednia aplikacja na grunty orne o użytki zielone,
- Separacja na frakcje stałą i ciekłą – aplikacja na pola,
- Kompostowanie- zastosowanie na pola, ogródki przydomowe,
- Uzlachetnianie składu- produkcja nawozów organicznych, środków poprawiających właściwości gleby.

Najczęstszym i najprostszym sposobem nawożenia jest bezpośrednia aplikacja na pola płynnego pofermentu. W porównaniu do surowej gnojowicy stosowanie pofermentu niesie za sobą szereg korzyści np.:

- Efektywniejsze wykorzystanie składników przez rośliny,
- Zmniejszenie ryzyka eutrofizacji wód (proces gromadzenia się materii organicznej w jeziorach w tempie przekraczającym jej zasymilowanie,
- Eliminacja patogenów i zarazków chorobotwórczych,
- Zniszczenie nasion chwastów, co ma istotny wpływ na zużycie chemicznych środków ochrony roślin,
- Zmniejszenie zanieczyszczenia wód gruntowych i powierzchniowych.

Wszechstronne wykorzystanie pofermentu obrazuje rysunek 2 [18, 19, 20].



Rysunek 2. Możliwości wykorzystania pofermentu

Źródło: Opracowanie Bio Alians

1.4. Mikroorganizmy beztlenowe obecne w biogazowni

Biogaz jest to produkt fermentacji beztlenowej związków pochodzenia organicznego, zawierających celulozę, skrobię, węglowodany i białka. Aby taka fermentacja odbyła się niezbędna jest obecność bakterii beztlenowych, które przeprowadzają ten proces. Potrzebne są określone parametry, w których poszczególne bakterie będą miały najkorzystniejsze warunki do życia i rozwoju.

Udowodniono, że poniższe parametry decydują o poprawnie przeprowadzonej fermentacji [21].

- Temperatura - inna dla różnych rodzajów bakterii-odpowiedni zakres temperatury wpływa na korzystny rozwój i rozmnażanie bakterii [22] np. w przypadku bakterii mezofilnych jest to pomiędzy 33 a 38°C

(min. 25°C max. 45°C), w przypadku bakterii termofilnych temperatury rozkładają się w granicach 55a 65°C (min. 40°C maks. 75°C), natomiast bakterie psychrofilne giną poniżej 0°C, a najkorzystniejszy rozwój jest przy temperaturze 15°C.

- Czas retencji - zależność dopływu nieczystości do pojemnika komory fermentacyjnej - odpowiednio długi czas retencji zapobiega wymywaniu mikroorganizmów beztlenowych z komory
- Odpowiednie obciążenie ładunkiem zanieczyszczeń organicznych (nie może być ani zbyt wysoki, ani zbyt niski)
- Zawartość tzw. Spowalniaczy procesu(inhibitorów) takich jak antybiotyki, środki ochrony roślin.

Ponadto [22] bakterie są wrażliwe na odczyn, który powinien być słabo zasadowy (pH ok 7,5) oraz na tlen i światło.

Na podstawie powyższych informacji wiadomo [22], że zmiana chociażby jednego z wymienionych czynników powoduje zwolnienie, a nawet w skrajnych przypadkach całkowite zahamowanie aktywności bakterii, prowadzące w konsekwencji do zmniejszania udziału metanu w gazie powstającym z procesu fermentacji. W końcowym etapie może dojść do całkowitego zatrzymania produkcji tzw. zakiśnięcie.

Mikroorganizmy beztlenowe obecne w biogazowni możemy podzielić na dwie grupy [23]. Do pierwszej grupy zaliczamy bakterie metanogenne, które bezpośrednio przeprowadzają reakcje metanogenne. Do drugiej grupy zaliczamy reakcje, które są wynikiem symbiozy lub synergizmu bakterii metanogennych w „ko-hodowlach”, w których warunki przemian są podobne jak w komorze fermentacyjnej.

Stwierdzono, że bakterie dostają się do komór fermentacyjnych razem z surowcem, biomasą. A więc są to bakterie odpowiadające swojej

biomasie. Odchody ludzkie, zwierząt gospodarskich i ptactwa hodowlanego w nich zawarte są bakterie żyjące w jelitach, a więc rodzime bakterie odpowiadające za przemiany w układzie trawiennym. Wraz z bakteriami występują również bakterie i wirusy chorobotwórcze. [23]

Bakterie metanogenne należą do królestwa *Prokaryota* do klasy *Archaeobacteriae*.

Bakterie metanogenne [23] pojawiły się w okresie powstawania życia na Ziemi tzn. ok 3, 4 miliardów lat temu. Są to bakterie, które bardzo licznie występują w przyrodzie i są jednymi z najważniejszych organizmów beztlenowych występujących na Ziemi. Występują w osadach mórz, oceanów, fermentujących osadów ściekowych, treści przewodów pokarmowych. Tworzą one wyspecjalizowaną grupę fizjologiczną a ponadto żyją w symbiozę z organizmami, które wytwarzają wodór. Nie rozkładają białek, węglowodanów ani wielkocząsteczkowych substancji organicznych. Mają różne kształty, nie tworzą przetrwalników a w ich komórkach nie zachodzi cykl Crebsa. W ścianach komórkowych zamiast mureiny jest pseudomureina. Są autotrofami (tzn. mają zdolność syntetyzowania związków organicznych z prostych związków nieorganicznych przy pomocy energii świetlnej) lub miksotrofami (tzn. że posiadają zdolność do odżywiania autotroficznego lub heterotroficznego w zależności od tego jakie są warunki środowiska- natężenie światła i obecność organicznych substancji pokarmowych i substratów fotosyntezy lub chemosyntezy. Występują u nich inne mechanizmy wiązania CO₂ niż u pozostałych autotrofów.

Poszczególne rodzaje mikroorganizmów beztlenowych [23] są odpowiedzialne za rozkład substancji organicznych (węglowodany, tłuszcze, białka).

Rozkład węglowodanów przebiega w taki sposób, że cukry złożone (celuloza, skrobia, sacharoza) w obecności wody (przebiega proces hydrolizy) są rozkładane do cukrów prostych (glukoza, fruktoza), a te z kolei są rozkładane do niższych kwasów organicznych, aldehydów, alkoholi. Te następnie są wchłaniane i utleniane do CO_2 i H_2O . Taka kolejność przemian powoduje, że powstają rozpuszczalne cukry, które są w stanie przeniknąć przez osłony i błony wnętrza komórek bakteryjnych.

Rozkład tłuszczów polega na tym, że lipidy izoproteinowe poprzez proces hydrolizy (w obecności wody) są rozkładane na tłuszcze złożone (glicerol, cholesterol, wyższe kwasy tłuszczowe od C_{15}), a te następnie są rozkładane do tłuszczów prostych (niższe kwasy organiczne, aldehydy). Na drodze dalszych przemian uwalniane są CO_2 i H_2O . W tym przypadku również taka kolejność przemian pozwala na powstanie rozpuszczalnych substancji, które są zdolne do przeniknięcia przez osłony lub błony do wnętrza komórek bakteryjnych.

Rozkład białek polega na tym, że białka proste oraz złożone na drodze hydrolizy rozkładane są do aminokwasów, na drodze dalszej hydrolizy wiązanie peptydowe może zostać zerwane tzn. od grupy karboksylowej COOH odłączane jest OH , grupa aminowa NH_2 traci H . W dalszym etapie powstają kwasy wielokarboksylowe, niższe kwasy organiczne, merkaptany (teraz tiole - są to związki, w których atom tlenu grupy hydroksylowej został zastąpiony atomem siarki, aminy). W dalszym procesie uwalniany jest dwutlenek węgla (CO_2), amoniak (NH_3) i siarczek wodoru (H_2S). Tak jak powyżej to widać takie przemiany

pozwalają na powstanie rozpuszczalnych substancji, które w takiej postaci mogą już przenikać do osłon lub błon komórek bakteryjnych.

Ogólnie w komorach fermentacyjnych wyróżniamy bakterie:

- Fermentacyjne, które odpowiadają za hydrolizę i fermentację substancji organicznych dostających się do komory fermentacyjnej;
- Bakterie wytwarzające wodór i kwas octowy- z powstających po fermentacji kwasów organicznych wytwarzają kwas octowy i wodór;
- Bakterie metanogenne- działają na dwa sposoby- w pierwszym sposobie następuje dekarboksylacja wcześniej powstałego kwasu octowego, z którego potem powstaje metan (CH_4) i dwutlenek węgla (CO_2). W drugim sposobie powstałe wcześniej dwutlenek węgla (CO_2) i wodór (H_2) ulegają procesom redukcyjnym i metanogennym, z których potem powstaje metan (CH_4) i dwutlenek węgla (CO_2).

Przykładowe [22] gatunki bakterii i rozkładany przez nie substrat:

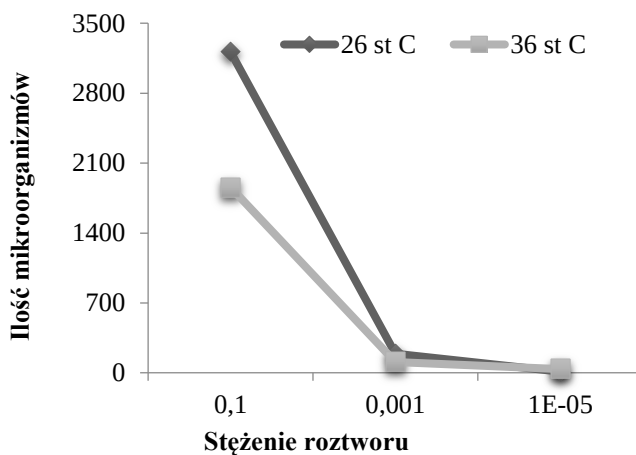
- *Methanobacterium omeliani* ten gatunek bakterii rozkłada przede wszystkim H_2 , etanol, alkohole 1 i 2 rzędu
- *Methanobacterium soxoydans* rozkładają kwas masłowy, octowy i kaproń
- *Methanobacterium sohngei* rozkładają kwas masłowy i octowy
- *Methanobacterium propionicum* rozkładają kwas propionowy
- *Methanobacterium formicum* rozkładają H_2 , CO_2 , kwas mrówkowy
- *Methanococcus mzei* rozkładają kwas masłowy i octanowy
- *Methanococcus vannielli* rozkładają kwas mrówkowy i H_2
- *Methanosarcina barkeri* rozkładają H_2 , CO, metanol, kwas octowy
- *Methanosarcina methanica* rozkładają kwas masłowy i octowy

2. Materiały i metody

Próbki pofermentu, z Biogazowni Ryboły, zostały pobrane w dwóch terminach wyszczególniając poferment jesienny (data pobrania 26.11.2015) i poferment zimowy (data pobrania 9.02.2016). Badania mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie ogólnej liczby bakterii beztlenowych. Oznaczenia przeprowadzono metodą zalewową na podłożu stałym (agar wzbogacony) oraz na podłożu płynnym bulionu wzbogaconego. Próby były inkubowane w temperaturze 25°C dla psychrofilnych bakterii i 36°C dla mezofilnych bakterii przez okres 48 godzin. Po tym czasie zliczono ilość mikroorganizmów beztlenowych obecnych na podłożu stałym. Analizy próbek z podłoża płynnego, po 48 godzinach intubacji w 36°C, dokonano na spektrofotometrze UV-Vis mierząc absorbancję przy długości fali 450 nm. Otrzymane wyniki zostały uśrednione dla wszystkich wykonanych powtórzeń.

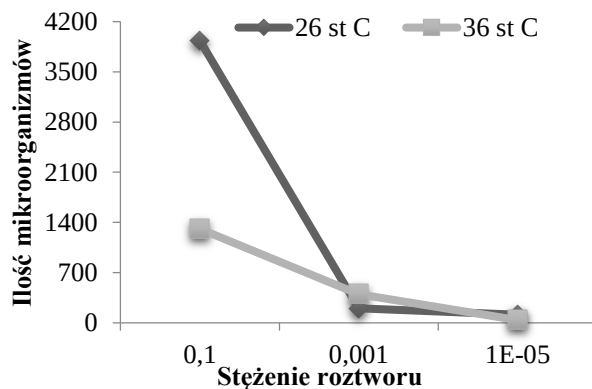
3. Wyniki

Poniżej przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznych. Została wykonana charakterystyka ilościowa mikroorganizmów beztlenowych mezofilnych i psychofilnych obecnych w pofermencie (Rysunek 3,4,5)



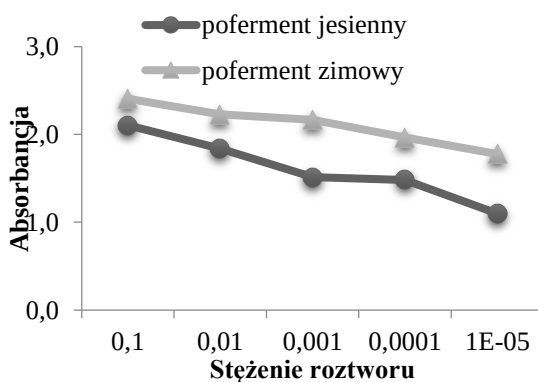
Rysunek 3. Ilość mikroorganizmów pofermentacji jesiennym

Źródło: Opracownai własne



Rysunek 4. Ilość mikroorganizmów pofermentacji zimowym

Źródło: Opracownai własne



Rysunek 5. Średnia wartość absorbancji roztworów osadów ściekowych w bulionie

Źródło: Opracownai własne

4. Wnioski

1. Z otrzymanych wyników badań wynika, że poferment zimowy charakteryzuje się większą ilością mikroorganizmów beztlenowych niż poferment jesienny. Świadczy to o wyższej intensywności przebiegających procesów fermentacji metanowej.
2. W obu przypadkach, zarówno próbie jesiennej i zimowej, zauważono większą ilość namnożonych mikroorganizmów w temperaturze 25°C, zatem obniżenie temperatury fermentacji mogło by wpłynąć na wyższą wydajność procesów biogazowania.
3. Próba przeprowadzona metodą zalewową potwierdza wyższą zawartość mikroorganizmów beztlenowych w pofermencie zimowym (zanotowano wyższe wartości absorbancji).

Praca została wykonana w ramach działalności Koła Naukowego

ROLKA – Rolnicze Koło Akademickie.



Literatura:

1. Ledakowicz S., Krzystek L. *Wykorzystanie fermentacji metanowej w utylizacji odpadów przemysłu rolno-spożywczego* Politechnika Łódzka.

2. Institut für Energetik und Umwelt gmbh. 2005. „*Biogaz - produkcja i wykorzystywanie*” Leipzig: Interreg
3. Kaltschmitt, M.; Hartmann, H. “*Energie aus Biomasse – Grundlagen, Techniken und Verfahren*” Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2001.
4. Laboratorium Biotechnologiczne firmy BIOGAZ ZENERIS Sp. z o.o.
5. e-biotechnologia.pl [dostęp: 20.02.2016]
6. agroenergetyka.pl [dostęp: 20.02.2016]
7. Joka M., *Efektywność energetyczna biogazowi i kotłowni opalanej biomasą*, Praca inżynierska, Politechnika Białostocka Wydział Mechaniczny, 2013
8. Magrel L. *Prognozowanie procesu fermentacji metanowej mieszaniny osadów ściekowych oraz gnojowicy*, Białystok 2004, str. 28-40.
9. Buraczewski G. *Fermentacja metanowa*, Warszawa 1989.
10. Czerwińska E. *Warunki prowadzenia procesu fermentacji metanowej w biogazowni*, Politechnika Koszalińska str. 12-14.
11. Yektaa S. S., Skyllberg U., Danielssona A., Björna A., Svenssona B. H., *Chemical speciation of sulfur and metals in biogas reactors—Implications for cobalt and nickel bio-uptake processes* Journal of Hazardous Materials (2016).
12. Institut für Energetik und Umwelt gGmbH „*Poradnik pozyskiwania i wykorzystywania biogazu. Rezultaty programu monitoringu biogazowni*” 2005.
13. Cebula J. *Biogazownie w niewielkich gospodarstwach*.
14. <http://malawies.pl/ftp/biogazownia/> [dostęp: 29.02.2016]
15. Piwowar A., Dzikuć M., Adamczyk J. *Agricultural biogas plants in Poland – selected technological, market and environmental aspects*

- Renewable and Sustainable Energy Reviews 58 (2016), str. 69–74.
16. biogazowniakropkroku.pl/pierwsza-na-podlasiu [dostęp: 3.01.2016]
 17. Pontus K. *Osad pofermentacyjny oraz jego wykorzystanie* InnoBaltica Gdańsk.
 18. German Biogas Association, 2004. *Biogas Plants in Germany and Installed Electrical Capacity, featured in “Current Progress and Practice in the Adoption of Anaerobic Digestion in the European Union”* Da Gomez, C. and Guest, C., Conference Proceedings, 2004, Enniskillen, Ireland.
 19. Bioalians *Rolnicze wykorzystanie pofermentu*.
 20. Gołębiewski M., *Zagospodarowanie substancji pofermentacyjnej z biogazowni rolniczej*.
 21. Oniszak-Popławska A., Zowsik M., Wiśniewski G. 2003. *Produkcja i wykorzystanie biogazu rolniczego*. Proces produkcji biogazu, str. 14-15.
 22. Lewandowski M., Ryms M. 2013. *Biopaliwa. Proekologiczne odnawialne źródła energii*. Wydawnictwo WNT, str. 467-471.
 23. Buraczewski G., Bartoszek B. 1990. *Biogaz - wytwarzanie i wykorzystanie. Procesy beztlenowego rozkładu substancji organicznych*. PWN Warszawa, str. 34-49.

mgr inż. Krzysztof Turczański¹⁾
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Leśny
Katedra Siedliskoznawstwa i Ekologii Lasu
ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań
¹⁾krzysztof.turczanski@gmail.com

Wpływ zmian klimatu na poziomie lokalnym na kondycję *Fraxinus excelsior* L. na przykładzie wybranych drzewostanów Nadleśnictwa Babki

*The impact of climate change on the local level on the condition
of *Fraxinus excelsior* L. based on selected stands of Babki Forest District*

Słowa kluczowe: *Fraxinus excelsior* L., Nadleśnictwo Babki, zmiany klimatu, kondycja
jesionu wyniosłego

Keywords: *Fraxinus excelsior* L., Babki Forest District, climate changes, common
ash condition

Streszczenie Jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior* L.) należy do gatunków charakterystycznych dla co najmniej trzech zbiorowisk roślinnych objętych ochroną w ramach sieci Natura 2000. W Polsce najczęściej występującą fitocenozą z omawianym gatunkiem jest łęg jesionowo-olszowy (*Fraxino-Alnetum*). Licznie występują również łęgi dębowo-wiązowo-jesionowe (*Ficario-Ulmetum minoris*) oraz podgórski łęg jesionowy (*Carici remotae-Fraxinetum*). Są to zbiorowiska roślinne charakteryzujące się złożoną fizjonomią, co wiąże się ze znacznym wpływem na cały ekosystem leśny. Struktura wymienionych siedlisk od początku lat 90-tych XX wieku stopniowo ulega degradacji. Obecnie za głównego winowajcę tego zjawiska uważa się grzybową chorobę jesionów powodowaną przez grzyba *Chalara fraxinea*. Przyczyną słabej kondycji jesionów są zmiany warunków klimatycznych i siedliskowych na poziomie lokalnym. W przypadku łęgów z udziałem opisywanego gatunku największą rolę odgrywają zmiany (obniżenie) poziomu wód gruntowych, długotrwałe susze, ciepłe i suche zimy, przymrozki późnowiosenne czy w konsekwencji procesy olsowienia i gładowienia. W rozpatrywanym artykule opisane zostaną główne czynniki określające stan zdrowotny

drzewostanów jesionowych, w konkluzjach nastąpi próba oceny wpływu zmian klimatycznych i siedliskowych na poziomie lokalnym na przykładzie Nadleśnictwa Babki.

1. Wstęp

Jesion wyniosły wymaga zasobnych, głębokich i wilgotnych gleb, stąd też spotykany jest głównie na siedliskach w typie lasu wilgotnego, olsu jesionowego czy lasu łęgowego. W uprawach notuje się go również jako gatunek domieszkowy w dużej mierze pochodzący ze sztucznego nasadzenia w typach lasu świeżego i lasu mieszanego świeżego. W Puszczy Białowieskiej dorasta do 35 m wysokości przy maksymalnej pierśnicy do 150 cm [Faliński, Pawlaczyk 1995]. Rośnie tam na stanowiskach lasów grądowych, na glebach brunatnych oglejonych lub płowych oglejonych, zasobnych w węglany wapnia. Ogromne znaczenie na występowanie jesionu ma wpływ warunków klimatycznych, najbardziej korzystny jest klimat umiarkowany typu atlantyckiego. Naturalny zasięg z optymalnym wzrostem i liczebnością znajduje się w Europie środkowej i północno-zachodniej. Wysokie opady, długi okres wegetacyjny i zasobne gleby stanowią miejsca najczęstszego występowania tego drzewa. W Europie rodzimymi gatunkami rodzaju *Fraxinus* są *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus ornus* oraz *Fraxinus angustifolia* [Bugala 2000]. W Polsce naturalny zasięg posiada tylko *Fraxinus excelsior*. W obrębie swojego występowania jesion wyniosły odznacza się dość szeroką skalą ekologiczną. Rośnie na żyznych, głębokich i wilgotnych stanowiskach w bezpośredniej bliskości rzek, potoków, spotka się go również na płytkich wapiennych glebach [Matuszkiewicz 2007]. Pojawia się także licznie w warunkach górskich (zbiorowisko *Carici remotae* – *Fraxinetum*). W Pirenejach, na Kaukazie

spotyka się okazy rosnące na wysokości do 1800 m n.p.m. [Boratyńska 1995]. W kraju jego udział nie jest znaczący. Potencjalne siedliska stanowią tylko około 2% [Zaręba 1986], lub 2,3% sumując udział typów siedliskowych lasu [Matuszkiewicz 2007]. Ekosystemy tworzone przez jesion należą do jednych z najbardziej czułych i szybko reagujących na zmiany warunków siedliskowych. Największy wpływ mają przede wszystkim warunki wodne. Zbyt długo stagnująca woda w obszarach depresyjnych, w obniżeniach terenu, lub woda zalewowa w pobliżu dużych zbiorników wodnych skutecznie wypiera opisywany gatunek na korzyść olszy czarnej (*Alnus glutinosa*) tworzącej zbiorowiska olsowe (proces olsowienia). Odwrotnym zjawiskiem jest przesuszanie terenu, związane z obniżaniem się poziomu wód gruntowych. Skutkuje to w ciągu kilku lat nadmiernym pojawianiem się w drzewostanie gatunków grądowych takich jak dęby, graby, lipy. W runie pojawia się roślinność zielna mająca cechy grądów jak choćby z rodzaju *Rubus* maliny, jeżyny czy niecierpek pospolity (*Impatiens noli-tangere*).

Stabilność ekosystemów tworzonych przez jesion wyniosły od przeszło dwudziestu lat zagrożona jest warunkami biotycznymi i abiotycznymi. Z powszechnie przytaczanych opinii twierdzono, iż choroby jesionu są wynikiem połączenia kilku czynników. Do najważniejszych zaliczano zwłaszcza zmianę poziomu wód gruntowych. Na terenach ze stagnującą wodą, w połączeniu z wysoką temperaturą inicjowane są procesy chorobowe, niska temperatura przy zalewaniu gruntu lub suszy również negatywnie wpływa na jesiony zwłaszcza I i II klasy wieku [Stocki 2001b]. W wyniku splotu niekorzystnych zjawisk na początku lat 90-tych XX wieku drzewa stały się bardziej podatne na owady i grzyby. Proces nasilonych symptomów

zamierania jesionu wyniosłego opisano po raz pierwszy w 1992 roku w północno-wschodniej Polsce w okolicach Białegostoku [Stocki 2001a]. Niedługo potem podobne objawy rozpoznano na terenie Wielkopolski, w tym min. na terenie Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu, w sąsiedniej Dyrekcji w Pile, na Lubelszczyźnie, na Pomorzu (Nadleśnictwa Elbląg, Gdańsk) [Stocki 2001a]. W ciągu kilku lat choroba objęła swoim zasięgiem całą populację kraju. Do 2012 ogarnęła większość terytorium kontynentalnej Europy. Wedle danych EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Programme) choroba rozprzestrzenia się 20-30 km rocznie [www.euforgen.org]. W 2012 roku pojawiła się na terenie Wysp Brytyjskich. Zjawisko to jest tym bardziej poważne, iż na terenie Anglii znajdują się największe powierzchnie z udziałem jesionu wyniosłego w Europie. W toku badań w 2006 roku po wyizolowaniu grzybów rosnących na zamierających jesionach w Nadleśnictwie Włoszczowa opisano nowy gatunek pod nazwą *Chalara fraxinea* [Kowalski, Łukomska 2005]. Najczęściej stwierdzano go na jesionach z objawami więdnienia, szczególnie uwidaczniających się na początku okresu wegetacyjnego [Kowalski 2007]. Grzyb poraża liście, młode pędy, strzałki i gałęzie zwłaszcza młodych okazów [Fronczak 2013]. Podstawowe objawy to usychanie pąków, pędów, defoliacja, nekrozy liści, pędów, pnia, zmiany chorobowe drewna, brunatnienie łyka, uszkodzenie łyka [Dmyterko i.in. 2003]. U dojrzałych osobników proces przebiega wolniej. Notuje się przede wszystkim wzmożony proces defoliacji w górnej części korony. Konary i pędy usychają. Drzewo broniąc się przed całkowitym ubytkiem aparatu asymilacyjnego często wytwarza pędy przybyszowe, choć jest to cecha bardzo zmienna i nie

występuje w każdym przypadku. Po kilkunastu latach walki duży procent drzew zamiera, część natomiast ulega znaczącemu osłabieniu.

2. Cel i zakres pracy

Celem przedstawionej pracy jest wstępna analiza kondycji i charakterystyka wybranych drzewostanów w typach siedliskowych lasu z udziałem jesionu wyniosłego. Związane to jest z określeniem tempa procesu zamierania jesionu wyniosłego w Polsce. Do analizy wybranych zostało sześć powierzchni znajdujących się na terenie Nadleśnictwa Babki, reprezentujących klasy wieku od IV do V (60-100 lat). Na powierzchniach przebadano drzewa z drzewostanu głównego tj. znajdujące się w pierwszych trzech klasach biosocjalnych klasyfikacji Krafca. Pomiary zgrupowano w dwa podstawowe bloki tj. analizę dendrometryczną i zdrowotną.

Analiza dendrometryczna zawierała następujące czynności:

- pomiar pierśnicy wszystkich wytypowanych drzew,
- pomiar wysokości wszystkich wytypowanych drzew.

Na podstawie wyżej wymienionych informacji określono następujące cechy dendrometryczne drzewostanów:

- średnią pierśnicę drzewostanu,
- średnią wysokość,

Analiza stanu zdrowotnego zawierała czynności związane z:

- oceną stanu zdrowotnego metodą drzewostanową (witalność i defoliacja),
- oceną zagrożeń i wpływu ekosystemu leśnego na drzewostany jesionowe.

Informacje zebrane z pomiarów terenowych wzbogacono o dane z opisów taksacyjnych oraz wydruki o stanie siedlisk badanych drzewostanów otrzymane dzięki uprzejmości Nadleśnictwa Babki.

3. Metodyka badań

Materiał badawczy wykorzystany w analizie wybranych drzewostanów w niniejszej pracy jest wynikiem pomiarów dokonanych na założonych sześciu tymczasowych powierzchniach doświadczalnych w Nadleśnictwie Babki, które podlega Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu. Prace prowadzono w czasie pełni okresu wegetacyjnego (lipiec-sierpień 2014 roku). Powierzchnie miały charakter tymczasowy, nie numerowano pomierzonych drzew, a jedynie wyznaczono jej powierzchnię i odznaczono kredą drzewa, na których dokonano już pomiaru celem uniknięcia podwójnego pomierzenia danej sztuki. Przebieg prac pomiarowych w każdym drzewostanie wyglądał następująco:

- wybór odpowiedniego drzewostanu spełniającego następujące warunki: występowanie jesionu wyniosłego w udziale minimum 10%. Czynność ta wykonana została w oparciu o dane zawarte w zaktualizowanym wydruku z bazy SILP dzięki uprzejmości Nadleśnictwa Babki,
- określenie powierzchni (z reguły jedno wydzielenie z ilością drzew minimum 20 sztuk),
- pomiar pierśnicy na wysokości 1,30 m w korze w dwóch kierunkach E-W oraz N-S, z dokładnością do 1 mm, za pomocą pierśnicomierza lub taśmy mierniczej (obwód). Za właściwą pierśnicę przyjmowano średnią arytmetyczną z obu pomiarów kierunkowych lub dwóch prób

pomiaru taśmą. W przypadku, gdy miejsce pomiaru wypadło na zniekształceniu pnia pomiar dokonywano poniżej i powyżej nieregularnego przekroju w równej odległości z przyjęciem średniej wartości,

- pomiar wysokości drzew z dokładnością do 10 cm. Do tego celu wykorzystano wysoce precyzyjny wysokościomierz firmy Vertex. W przypadku drzew pochylonych pomiar dokonywano z kierunku prostopadłego do płaszczyzny nachylenia sztuki z odległości odpowiadającej oszacowanej wysokości drzewa.

Wykonanie wizualnej oceny stanu zdrowotnego drzew dokonano w oparciu o cechy morfologiczne korony. Podstawowymi kryteriami tej oceny były:

- defoliacja z dokładnością do 5% dla całej długości korony. Oceny dokonano za pomocą tablic ubytku aparatu asymilacyjnego.

Stopień	Procent defoliacji	Ocena drzewa
0	0-10%	zdrowe
1	11-25%	słabo uszkodzone
2	26-60%	średnio uszkodzone
3	61-99%	silnie uszkodzone
4	100%	martwe

- witalność drzewa [Roloff 2001] dla górnej, wierzchołkowej części korony.

Stopień	Faza	Ocena drzewa
0	eksploracji	nieuszkodzone, witalne
1	degeneracji	osłabione
2	stagnacji	uszkodzone
3	rezygnacji	obumierające

Następnie wykorzystano syntetyczny wskaźnik uszkodzenia drzewa (*Syn*), zaproponowany do oceny uszkodzenia liściastych gatunków drzew, powstały z połączenia defoliacji i witalności drzewa, określany wzorem [Dmyterko 2003]:

$$Syn = 0,5 (0,03 \times Def + Wit) \quad (1)$$

gdzie:

Def – defoliacja [%],

Wit – witalność [stopnie].

Otrzymana za pomocą wzoru wartość *Syn* zalicza badany drzewostan lub drzewo do jednego z czterech stopni uszkodzenia:

Stopień	Wartość SYN	Ocena drzewa
0	0,0-0,5	zdrowe
1	0,5-1,5	słabo uszkodzone
2	1,5-2,5	średnio uszkodzone
3	pow 2,5	silnie uszkodzone

We wzorze (1) wyrażenie $0,03 \text{ Def}$ ma zakres wartości od 0 do 3, a więc identyczny z zakresem możliwych ocen witalności. Pozwala ono zamienić zakres oceny defoliacji z procentowego na czterostopniowy, jak dla witalności. Obie cechy – defoliacja i witalność są traktowane równoważnie. Połączenie uzasadnione jest istotną i silną korelacją syntetycznego wskaźnika uszkodzenia drzewa zarówno z defoliacją, jak i witalnością [Dmyterko, Bruchwald 2006].

Celem określenia witalności wykorzystano charakterystykę faz rozwoju u jesionu [Dmyterko, Bruchwald 2006]:

- Faza eksploracji (0) górną część korony tworzą długie, gęsto ugałęzione pędy główne. Gęsta jest także cała korona drzewa.

- Faza degeneracji (1) objawia się wytwarzaniem znacznie krótszych pędów głównych. Ich ugałęzienie tworzą pędy linearne i krótkopędy. Górna część korony jest prześwietlona, a środkowa gęsta, wypełniona szczególnie liśćmi.
- Faza stagnacji (2) przedłużeniem osi pędów głównych są pędy linearne lub krótkopędy. Ulistnione kilkuletnie pędy główne, pozbawione ugałęzienia bocznego, upodobią się tak, jak u dębu do struktur nazywanych ogonami pudła. Część pędów głównych zamiera, a proces ten objawia się często usychaniem pąków, a tym samym brakiem liści. Cała korona ulega przerzedzeniu. Prowadzi to zwykle do obfitego kwitnienia drzewa.
- Faza rezygnacji (3) zachodzi intensywny proces zamierania pędów nie tylko w górnej, ale również w pozostałej części korony. Na niektórych wieloletnich pędach oraz na pniu rozwija się rzadka korona wtórna. Drzewo zamiera.

4. Charakterystyka powierzchni

4.1. Warunki klimatyczne

Region, w którym prowadzono badania należy do III krainy przyrodniczo-leśnej, a mianowicie do Krainy Wielkopolsko-Pomorskiej. Kraina Wielkopolsko – Pomorska zaliczana jest do obszarów o przemiennym napływie mas powietrza oceanicznego i kontynentalnego. Wahania te przynoszą zmienną pogodę z dominacją napływu wilgotnych mas powietrza polarnomorskiego z zachodu, które latem przynoszą ochłodzenie i opady atmosferyczne, natomiast zimą ocieplenie i opady śniegu. Od wschodu nad Wielkopolskę napływają suchsze masy

powietrza przynosząc znaczne zmniejszenie opadów w skali całego roku. Średnia roczna temperatura powietrza w tym regionie wynosi od około 7,5°C na wschodzie i do 8,4°C na zachodzie. Roczna suma opadów dla Wielkopolski należy do najniższych w skali kraju i wynosi 600 mm. Najniższe wartości (średnio 550 mm) notuje się w środkowej części na obszarze Pojezierzy Poznańskiego i Gnieźnieńskiego.

W rozpatrywanym Nadleśnictwie roczna suma opadów wynosi 512 mm. Okres wegetacyjny ze średnią temperaturą dobową powyżej 5°C waha się od 218 do 232 dni, najwcześniej rozpoczyna się w końcu marca na zachodzie regionu i około pierwszego tygodnia kwietnia na północnym wschodzie [Matuszkiewicz 2007].

4.2. Opis nadleśnictwa

Lasy Nadleśnictwa Babki przed II wojną światową stanowiły własność prywatną, głównie majątkową i chłopską, Fundacji Kórnickiej i Lasów Państwowych. W 1945 roku, bezpośrednio po wyzwoleniu Polski z licznych kompleksów dawnych właścicieli utworzono cztery Nadleśnictwa: Kórnik, Ludwikowo, Poznań i Wierzonka. W październiku 1946 roku Nadleśnictwo Wierzonka uległo likwidacji, a jego tereny rozdzielono pomiędzy nadleśnictwa Biedrusko, Poznań i Zielonka. W 1947 roku z Nadleśnictwa Kórnik wyodrębniono Nadleśnictwo Babki. Na podstawie Zarządzenia DGLP nr 47 z dnia 22 sierpnia 2007 roku zasoby Nadleśnictwa Babki powiększone zostały o obecne Leśnictwo Mechowo oraz kompleks leśny Antoninek. W obecnych granicach nadleśnictwo składa się z dwóch obrębów Babki i Kórnik i dziewięciu leśnictw: Drapałka, Kobylepole, Mieczewo, Rogalin, Mechowo, Błazejewo, Czmoń, Łękno, Mechlin [www.babki.poznan.lasy.gov.pl].

W Nadleśnictwie Babki procentowy udział siedlisk wilgotnych, łągowych stanowiących ekosystemy sprzyjające jesionowi wyniosłemu przedstawia się następująco:

Las mieszany wilgotny (LMw) - 3,0%,

Las wilgotny (Lw) - 2,0%,

Ols (Ol) - 1,0%,

Ols jesionowy (Olj) - 1,0% [www.babki.poznan.lasy.gov.pl].

Największy obszar zajmują drzewostany jednogatunkowe, spośród których dominują monokultury z udziałem sosny pospolitej. Wśród powierzchni dwu, trzy i więcej gatunkowych przeważa sosna z udziałem dębu, brzozy oraz innych drzew liściastych. Jesion wyniosły pojawia się licznie na siedliskach lasu świeżego i lasu mieszanego świeżego co jest efektem przeobrażenia siedlisk w sposób antropogeniczny i częściowo w wyniku procesów gładowienia, co jest zjawiskiem charakterystycznym dla dużej części Wielkopolski. Na siedliskach w typie olsu jesionowego i lasu łągowego występuje nielicznie na terenie rozpatrywanego nadleśnictwa [www.babki.poznan.lasy.gov.pl].

4.3. Syntetyczna charakterystyka siedliskowa

Powierzchnie badawcze podlegające analizie w niniejszej pracy założone zostały na siedliskach lasowych, w wydzieleniach z udziałem jesionu wyniosłego, dlatego też w wyniku oceny składu gatunkowego runa leśnego, drzewostanu i gleby w Operacie Glebowo Siedliskowym wyróżnione zostały następujące zbiorowiska roślinne *Fraxino-Alnetum* oraz *Ficario-Ulmetum minoris*.

Gatunkami najczęściej występującymi były:

- w warstwie drzewostanu: olsza czarna (*Alnus glutinosa*), jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior*), dąb szypułkowy (*Qercus robur*), wiąz szypułkowy (*Ulmus leavis*), sosna pospolita (*Pinus sylvestris*), lipa drobnolistna (*Tilia cordata*),
- w warstwie krzewów: czerechcha zwyczajna (*Padus avium*), leszczyna pospolita (*Corylus avellana*), bez czarny (*Sambucus nigra*).
- w warstwie zielnej: niecierpek pospolity (*Impatiens noli-tangere*), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), gajowiec żółty (*Galeobdolon luteum*), gwiazdnica gajowa (*Stellaria nemorum*), śledziennica skrzętolistna (*Chrysosplenium alternifolium*), czartawa pospolita (*Circaea lutetiana*), tojeść zwyczajna (*Lysimachia vulgaris*).

4.4. Charakterystyka powierzchni

Z opisu taksacyjnego Nadleśnictwa Babki wytypowano 6 powierzchni z udziałem jesionu wyniosłego w wieku 60-100 lat. Na powierzchniach pomierzono po 20 drzew wybranych losowo w centrum wydzielienia. Powierzchnie zlokalizowano w typach siedliskowych lasu:

- 2 powierzchnie na Lw (las wilgotny),
- 2 powierzchnie na Olj (ols jesionowy),
- 2 powierzchnie na Lśw (las świeży).

5. Zestawienie wyników

5.1. Struktura grubości drzewostanów

Na podstawie pomiarów grubości drzewostanów wykonano analizę porównawczą poszczególnych klas wieku. Najważniejsze informacje zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Cechy struktury pierśnic drzewostanów od IV do V klasy wieku

Klasa wieku	$\bar{d}$ [cm]	S [cm]	V [%]	Max frekwencja [szt.]
IV	47,8	5,30	16,61	60
V	55,2	5,71	16,02	60

Źródło: Opracowanie własne

Stwierdzono, iż średnia pierśnica wzrasta wraz z wiekiem drzewostanów. Drzewostany starszych klas wieku charakteryzują się największym rozstępem pierśnic, a co za tym idzie przesunięciem maksymalnej frekwencji drzew w kierunku większych stopni grubości. W terenie przekłada się to na obecność drzew o zróżnicowanej strukturze grubości. Rozkład pierśnic rozpatrywać można również pod kątem rozłożenia grubości i tempa jego zmiany. Uwidacznia to współczynnik zmienności [V%].

5.2. Struktura wysokości drzewostanów

W oparciu o pomiary wysokości wszystkich drzew opracowana została charakterystyka wysokości. Dane zebrano i pogrupowano w jednometrowe klasy wysokości z określeniem frekwencji drzew

w poszczególnych klasach. Przy tej analizie zastosowano zależność między wysokością i pierśnicą drzew celem zaobserwowania rozkładu wysokości w drzewostanie oraz wyliczenia przeciętnej wysokości dla dowolnego stopnia pierśnicy. Istotnym momentem był wybór funkcji przy wykreślaniu krzywej wysokości dla poszczególnych drzewostanów. Najdokładniejszą i najlepiej obrazującą zależność między pierśnicą a wysokością była funkcja w postaci wielomianu 2 stopnia. Poza typowymi danymi statystycznymi takimi jak wartości maksymalne, minimalne odchylenie standardowe i współczynnik zmienności, wyliczono wartości średnie na podstawie dwóch wzorów dendrometrycznych charakterystycznych dla drzewostanów liściastych:

1) wzoru na średnią arytmetyczną [Bruchwald 1999]:

$$\bar{h} = \frac{n_1 * h_1 + n_2 * h_2 + \dots + n_n * h_n}{n_1 + n_2 + \dots + n_n} = \frac{\sum n_i * h_i}{N} \quad (2)$$

2) wzoru Lorey'a [Bruchwald 1999]:

$$h_L = \frac{n_1 * g_1 * h_1 + n_2 * g_2 * h_2 + \dots + n_n * g_n * h_n}{n_1 * g_1 + n_2 * g_2 + \dots + n_n * g_n} = \frac{\sum n_i * g_i * h_i}{G} \quad (3)$$

gdzie:

n - liczebność w stopniach grubości [szt.],

h - średnie wysokości stopni wysokości [m],

g - pierśnicowe pole przekroju dla stopni grubości,

N - liczba drzew na powierzchni [szt.],

G - pierśnicowa powierzchnia przekroju drzewostanu [m²].

Najczęściej stosowanym w dendrometrii sposobem na określenie średniej wysokości drzewostanu jest wzór zaproponowany przez Lorey'a, gdyż tak wyliczona wysokość ważona jest pierśnicowym polem przekroju. Na podstawie równań krzywej wysokości wyliczone zostały średnie wysokości drzewostanów na powierzchniach badawczych. Okazało się, iż wzór zaproponowany przez Lorey'a dał wielkości nieco wyższe niż średnia arytmetyczna. Analiza wysokości wykazała następujące prawidłowości ukazane w tabeli 2:

Tabela 2. Podstawowe dane struktury wysokości

Klasa wieku	Liczba drzew (szt.)	Średnia wysokość (m)		Odchylenie standardowe (m)	Współczynnik zmienności (%)
		arytmetyczna	Lorey'a		
IV	60	26,8	26,9	2,06	6,89
V	60	27,5	28,1	2,89	10,21

Źródło: Opracowanie własne

5.3. Analiza stanu zdrowotnego

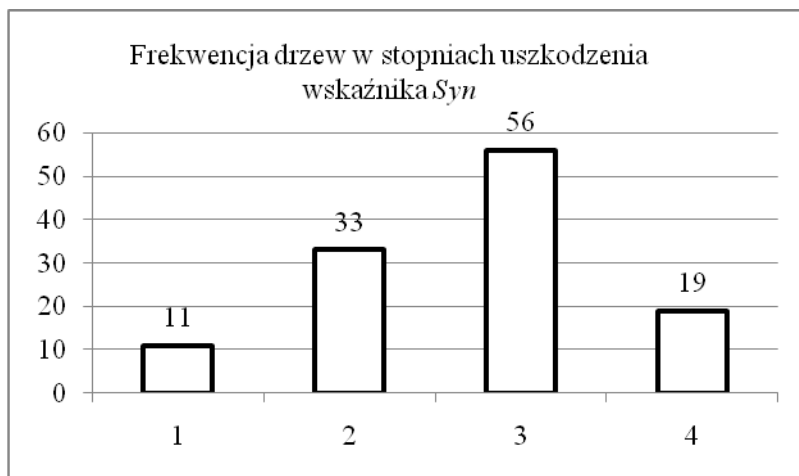
Wykonanie wizualnej oceny stanu zdrowotnego drzew dokonano w oparciu o cechy morfologiczne korony. Podstawowymi kryteriami tej oceny były defoliacja i witalność drzewa. Zastosowano metodę drzewostanową. Defoliację drzewa określono z dokładnością do 5%. Za wzór posłużyły tablice pochodzące z „Atlasu ubytku aparatu asymilacyjnego drzew leśnych” [Borecki, Keczyński 1992]. Witalność oznaczono w skali Roloffa.

W konkluzjach zastosowano syntetyczny wskaźnik uszkodzenia drzewa (*Syn*), zaproponowany do oceny uszkodzenia liściastych

gatunków drzew, powstały z połączenia defoliacji i witalności drzewa, określany wzorem [Dmyterko 2003]:

$$\text{Syn}=0,5 (0,03 \times \text{Def} + \text{Wit}) \quad (1)$$

Ocenie zdrowotnej poddane zostały wszystkie drzewa. Określono ich podstawowe cechy dendrometryczne. W analizowanych wydzieleniach jesiony w głównej mierze należały do drzewostanu głównego, a więc były gatunkiem górującym, panującym lub w kilku przypadkach współpanującym. Wykorzystano witalność i defoliację, które nie są silnie skorelowane z przyrostem pierśnicy. Na przyrost drzewa wpływa bowiem wiele czynników, które mogą nie być skorelowane z witalnością lub w odmienny sposób na nią oddziaływać (brak interakcji). Ponadto analiza defoliacji i witalności osobno obciążona może być błędem wynikającym z braku powiązania ich z przyrostem drzewa [Dmyterko 2006]. W tym celu zastosowano syntetyczny wskaźnik uszkodzenia drzewa (*Syn*), zaproponowany do oceny uszkodzenia liściastych łączący oba składniki i równoważący je z przyrostem drzewa. Termin witalność oznacza potencjał wzrostu, czyli zdolność drzewa do konkurencji z innymi osobnikami oraz do regeneracji. Przejawia się to długością pędów i ich liczbą w wierzchołkowej części korony.



Rysunek 1. Zbiorcze zestawienie liczby drzew w stopniach uszkodzenia

Źródło: Opracowanie własne

W wyniku pomiaru 6 drzewostanów z udziałem jesionu dokonano oceny stanu zdrowotnego 119 drzew (jeden pomiar był wynikiem błędu powtórzenia). Odsetek drzew zdrowych wyniósł 9,2%. Następne stopnie kolejno zawierały się w procentach 27,7% (1), 47,1% (2), 16,0% (3). Współczynnik determinacji dla podanych wyników wyniósł 0,95. Dane wskazują jednoznacznie, iż poziom uszkodzenia drzewostanów jesionowych dominuje w stopniu 2, co sumarycznie wskazuje na średni poziom uszkodzenia. W drzewostanach o największym stopniu uszkodzenia zanotowano zamieranie całych koron i występowanie pędów przybyszowych. Zaobserwowano znaczny udział defoliacji, przerzedzenia koron w postaci luk i ulistnienia kępowego. Udział martwych gałęzi zawierał się znacznie powyżej 50%. Wystąpiły również w 3 przypadkach ślady żeru i kanały wylotowe szkodników owadzych *Hylesinus varius* i *Hylesinus crenatus*. Udział martwego drewna jesionowego najwyraźniej zaznaczył się w olsie jesionowym. Proces zamierania odnotowano we wszystkich typach lasu. Najwyższy wskaźnik SYN wystąpił na lesie wilgotnym (Lw), co jest zjawiskiem typowym dla tego typu siedlisk

na terenie Wielkopolski. Wiąże się to z procesem osłabienia kondycji drzew w wyniku obniżania się poziomu wody gruntowej.

6. Dyskusja i wnioski

Ocena kondycji jesionów na rozpatrywanych powierzchniach badawczych pozwala wysnuć wnioski związane z wpływem procesu zamierania jesionu wyniosłego na ekosystem leśny, w którym się znajdują. W zbiorowisku *Fraxino-Alnetum* występują nieliczne gatunki przechodzące z olsów, takie jak choćby: tojeść pospolita, przytulia błotna, karbieniec pospolity, kosaciec żółty i inne [Matuszkiewicz 2007]. Nie występują tu natomiast gatunki siedlisk borowych, w przeciwieństwie do często spotykanych przedstawicieli żyznych lasów grądowych. Fitocenozy omawianego zespołu należą do najbogatszych pod względem składu gatunkowego. W badaniach fitosocjologicznych notuje się od 22 do 73 gatunków, średnio 46 [Matuszkiewicz 2007]. Zespół łągu jesionowo-olszowego wykazuje wyraźną zmienność siedliskową zależną od wilgotności. Spotkać można obszary zabagnione, wilgotne i suchsze. Wykształcają się zatem formy zbliżone od olsów do grądów, co przenosi się na mozaikowatość mikrosiedlisk, najczęściej ma to miejsce na obszarach ekotonowych, stanowiących łagodne przejście z jednego siedliska w inne.

Ekosystem lasów z udziałem jesionu wyniosłego należy do najbardziej czułych zbiorowisk na terenie Polski. Cecha ta odnosi się do większości siedlisk podmokłych, wilgotnych, narażanych na przesuszanie. Siedliska tego typu są priorytetem w działaniach mających za cel zachowanie nienaruszonych fragmentów lasu, mających warunki zbliżone do zbiorowisk naturalnych. Lasy łągowe, pełnią ważną

rolę w ochronie wód i gleb leśnych. Naukowcy zajmujący się ochroną wód podziemnych podkreślają filtracyjne i retencyjne właściwości gleb na tych terenach. Czynnikiem odpowiedzialnym jest zwarty, wielogatunkowy drzewostan, ograniczający ilość promieniowania słonecznego, zwiększający temperaturę gleby i przyspieszający w konsekwencji rozkład ściółki [Szymański 2000]. Ochrona gleb w przedstawianym ekosystemie jest bardzo ważnym aspektem. Zachwianie struktury siedliska wpływa na wszystkie tworzące go elementy. Łęgi z udziałem jesionu stanowią również istotny element ochrony przeciwpowodziowej. Podczas zwiększenia się poziomu wód zmniejszają prędkość i siłę wody, zatrzymują jej nadmiar chroniąc tym samym tereny położone niżej. Są naturalnym filtrem, nie wymagającym żadnych nakładów finansowych, pobierają z wody azot, fosfor czy pozostałości pestycydów.

Zamieranie drzewostanów jesionowych wydaje się mieć istotny wpływ na funkcjonowanie całego ekosystemu. Jesion wyniosły jest ważnym elementem składowym zbiorowisk lasów łęgowych. Choroba dziesiątkuje jesiony we wszystkich klasach wieku, przy czym nasilenie objawów chorobowych nie rozkłada się na ogół w poszczególnych drzewostanach równomiernie. Znikanie jesionu z siedlisk łęgowych stanowi poważne zagrożenie dla istnienia tego typu zbiorowisk. Na rozpatrywanych powierzchniach jest on łącznie z olszą czarną gatunkiem charakterystycznym. Pełne zwarcie w drzewostanie wielogatunkowym jest ważnym aspektem fitoklimatu, stanowi podstawę kompleksowości ekosystemu, co przenosi się na pełnione przezeń funkcje. Specyfika tego typu łągów istotnie wpływa na poziom wód gruntowych, na ich retencję, filtrowanie. Znikanie jesionu otwiera drogę

często gatunkom grądowym, które mają inne reżimy wodne i glebowe. Ich pojawienie się ma wpływ na późniejszy wygląd ekosystemu leśnego. Z biegiem czasu struktura lasu, jego skład ulec może zmianie, dlatego podkreślić należy, iż proces zamierania jesionu znacząco wpływa na przyspieszenie tego zjawiska. W rozpatrywanym Nadleśnictwie Babki w obszarach o największym stopniu uszkodzenia omawianego gatunku obserwuje się stopniowe przekształcanie ekosystemu. Poziom wód ulega obniżaniu, występuje większe nasłonecznienie gleby. Wraz z dużym stopniem defoliacji jesionów, pojawia się w dnie lasu więcej światła, które tworzy dogodne warunki rozwoju dla gatunków grądowych, najczęściej znajdujących się w bliskim otoczeniu. Ekosystem tworzony przez całość warunków biotycznych i abiotycznych ulega zachwianiu. Powolne przemiany łągów stanowią poważny problem w ochronie tych czułych siedlisk. Niewątpliwie jednak przy okazji analizy powierzchni z Nadleśnictwa Babki uwidacznia się obraz pogarszania stosunków wodnych na siedliskach lasu wilgotnego i olsu jesionowego. Za tym idą zmiany w strukturze i kondycji drzewostanów jesionowych. Wzmoczone wydzielanie się drzew i defoliacja starszych osobników jest wynikiem splotu wielu czynników biotycznych i abiotycznych. Spośród nich niewątpliwie na pierwszym miejscu wymienić należy charakterystyczne dla Wielkopolski zjawisko stepowienia i spadku poziomu wód gruntowych. Obszar ten należy do najsuchszych na terenie kraju. Poza spadkiem kondycji jesionu zwłaszcza na siedliskach wilgotnych, które uległy przesuszeniu, widocznym objawem jest wkraczanie roślin typowych dla lasów grądowych, zwłaszcza z rodzaju *Rubus* (malin, jeżyn).

Konkludując należy stwierdzić, iż na przykładzie wybranych powierzchni w Nadleśnictwie Babki kondycja jesionu wyniosłego jest splotem niekorzystnych warunków przyrody nieożywionej (głównie spadku poziomu wód gruntowych) oraz czynników przyrody ożywionej - grzyba *Chalara fraxinea* atakującego osłabione drzewa.

Literatura:

1. Boratyńska K.: *Systematyka i geograficzne rozmieszczenie* [w:] *Jesion wyniosły Fraxinus Excelsior L.*, Seria: Nasze Drzewa Leśne, pod red. Barzdajn W., Wyd. PAN, Poznań 1995.
2. Borecki T., Keczyński A.: *Atlas ubytku aparatu asymilacyjnego drzew leśnych*. Agencja Reklamowa Atut, Warszawa 1992.
3. Bruchwald A.: *Dendrometria*, Wyd. SGGW, Warszawa 1999.
4. Bugała W.: *Drzewa i krzewy*. Wyd. PWRiL, Warszawa 2000.
5. Dmyterko E., Bruchwald A.: *Kryteria oceny uszkodzenia ważniejszych gatunków drzew liściastych*. Leśne Prace Badawcze, 2006 Nr 3: str. 115-124.
6. Dmyterko E., Wojtan R., Bruchwald A.: *Stan zdrowotny drzewostanów jesionowych (Fraxinus excelsior L.) Nadleśnictwa Mircze*. Sylwan 2003 Nr 12: str. 9-18.
7. Faliński J.B., Pawlaczyk P.: *Zarys ekologii* [w:] *Jesion wyniosły Fraxinus excelsior L.* Seria: Nasze Drzewa Leśne, pod red. Barzdajn W. Wyd. PAN, Poznań 1995.
8. Kowalski T., Łukomska A.: *Badania nad zamieraniem jesionu (Fraxinus excelsior L.) w drzewostanach Nadleśnictwa Włoszczowa*. Acta Agrobotanica vol. 58, z. 2 – 2005, str. 429–440.

9. Kowalski T.: *Chalara fraxinea* - nowo opisany gatunek grzyba na zamierających jesionach w Polsce. Sylwan 2007 Nr 4, str. 44-48.
10. Matuszkiewicz J. M.: *Zespoły leśne Polski*. PWN, Warszawa 2007.
11. Roloff A.: *Baumkronen. Verständnis und praktische Bedeutung eines komplexen Naturphänomens*, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co. Stuttgart 2001.
12. Stocki J.: *Przyczyny zamierania drzew i drzewostanów jesionowych w Polsce* (1). Głos Lasu, 2001, Nr 4, str. 17–19.
13. Stocki J.: *Przyczyny zamierania drzew i drzewostanów jesionowych w Polsce* (2). Głos Lasu, 2001, Nr 6, str. 10-13.
14. Szymański S.: *Ekologiczne podstawy hodowli lasu*. PWRiL, Warszawa 2000.
15. Zaręba R.: *Znaczenie jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) w gospodarce leśnej kraju*. Sylwan, 1986 Nr 7, s= str. 9-16.
16. www.euforgen.org [dostęp: 30 III 2016].
17. www.babki.poznan.lasy.gov.pl [dostęp: 30 III 2016].

inż. Sylwia Tymosiak¹⁾, dr inż. Irena Kaszkowiak
Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii
ul. Wiejska 45A, Białystok
¹⁾laura1913@wp.pl

Ocena stanu sanitarnego wybranych studni kopanych na terenie miejscowości Markowo

*Evaluation of sanitary condition of selected dug wells situated
in the village Markowo*

Słowa klucze: studnie kopane, mikrobiologia wód podziemnych, stan sanitarny wody

Keywords: dug wells, microbiology of groundwater, sanitary condition of water

Streszczenie: Woda odgrywa ogromną rolę w skali całego świata. Jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmów ludzi, zwierząt i roślin. Wody podziemne (wody studzienne) są jednym ze znaczących źródeł wód słodkich, a w konsekwencji wód przeznaczonych do spożycia.

Celem pracy było zbadanie jakości wody w studniach kopanych i określenia czy dane wody spełniają wymagania stawiane wodzie do picia dla ludzi i zwierząt.

Przeprowadzono następujące analizy bakteriologiczne: oznaczenia ogólnej liczby bakterii, bakterii grupy *coli* typu ogólnego i typu termotolerancyjnego, a także oznaczenia paciorkowców kałowych. W pracy przedstawiono wyniki badań stanu sanitarnego wody z trzech przydomowych studni zlokalizowanych w miejscowości Markowo. Wyniki wykazały, że analizowane wody nie nadają się do spożycia przez ludzi. We wszystkich studniach stan sanitarny wód określono jako zły. Zostały przekroczone normy stawiane wodzie przeznaczonej do spożycia.

1. Wstęp

Woda jest zasobem przyrody odgrywającym ogromną rolę w skali całego świata. Zajmuje ona większą część powierzchni globu, a także

około 70% masy dorosłego człowieka. Jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmów ludzi, zwierząt i roślin.

W środowisku bardzo istotną rolę odgrywają wody podziemne. Są one jednym ze znaczących źródeł wód słodkich, a w konsekwencji wód przeznaczonych do spożycia. Mimo że zalegają pod warstwą ziemi, działającej jako filtr, można w nich spotkać wiele zanieczyszczeń. Przedostają się one w dużym stopniu wraz z wodami opadowymi, a ich ilość zależna jest od rodzaju gruntu na jakim się znajdują. Woda jest także środowiskiem sprzyjającym rozwojowi mikroorganizmów.

Większość społeczeństwa czerpie wodę z wodociągów, jednakże istnieją jeszcze domostwa, w których dodatkowym lub wyłącznym źródłem są przydomowe studnie kopane. Woda wodociągowa jest stosunkowo „bezpieczna” w spożyciu, ponieważ jej skład oraz zawartość w niej mikroorganizmów są systematycznie kontrolowane. W przypadku studni sytuacja jest nieco inna. Nie są one kontrolowane przez sanepid. Większość kopanych szybów prawdopodobnie znajduje się na obszarach wiejskich, prywatnych posesjach. Są to obiekty z których korzysta zazwyczaj jedna rodzina i to w jej interesie leży dbanie o czystość wody. Właściciele nie przywiązują jednak zbyt dużej wagi do stanu sanitarnego swoich źródeł. Nie zlecają żadnych badań, a zanieczyszczona woda może stać się niebezpieczna dla nich samych. Takie bagatelizowanie problemu może być wywołane brakiem świadomości u mieszkańców, a także brakiem funduszy na przeprowadzenie kompleksowych badań.

Obszary wiejskie to w większości przypadków gospodarstwa rolne, czy też rolno - hodowlane, będące ważnym źródłem zanieczyszczenia wód podziemnych. Chodzi tu głównie o spływy powierzchniowe i odcieki ze składowisk obornika.

Dzięki badaniom sanitarnym wody można wykryć drobnoustroje chorobotwórcze, zagrażające zdrowiu człowieka. Zważywszy na to, że jest ono najcenniejszym skarbem człowieka powinno się wykonywać okresowe badania wszystkich użytkowanych wód, w tym także czerpanych ze studni indywidualnych.

2. Wody w rolnictwie

Woda w rolnictwie ma szerokie zastosowanie. Związane są z nią wszelkie funkcje obszarów wiejskich, począwszy od produkcji żywności, przez osadnictwo, do odtwarzania zasobów. Jak podaje Koc, aż 69% światowego wykorzystania wody słodkiej przypada na rolnictwo (przemysł 23%, gospodarstwa domowe 8%). W przypadku Polski, zużycie jest dużo niższe i sięga maksymalnie do 10%. Woda potrzebna jest to wielu celów, jest to np: konsumpcja, przygotowywanie posiłków czy też higiena. Jej zużycie rozpatrywane jest także w aspekcie produkcji: potrzeby wodne roślin, przetwórstwo pasz i żywności, a także produkcja zwierzęca [1].

Zwierzęta hodowlane w gospodarstwach rolnych zużywają znaczące ilości wody. Według Rozporządzenia Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody [2], można określić średnie zużycie wody w fermach i obiektach inwentarskich. W Tabeli 1., przedstawiono, zaczerpnięte z wyżej wspomnianego Rozporządzenia, statystyczne ilości zużywanej wody przez konkretne zwierzęta hodowlane.

2.1. Źródła zanieczyszczeń na obszarach wiejskich

Na terenie zagrody wiejskiej można wyszczególnić różne źródła zanieczyszczeń. Jednym z nich są ścieki, w szczególności nieoczyszczone. Najbardziej niebezpieczne są te zrzuty ścieków, które mają „dziki” charakter, gdzie brak jest szczelnych zbiorników, przemyślanego planu na ich przechowywanie. Mogą pochodzić z gospodarstw domowych (ścieki bytowo – gospodarcze), z produkcji czy przetwórstwa rolno – spożywczego, a także z zakładów zajmujących się naprawą sprzętu rolniczego. Istotnym źródłem jest także gnojowica, a dokładnie jej wycieki spowodowane nieprawidłowo zaprojektowanymi lub wykonanymi zbiornikami. Do wód podziemnych mogą się również przedostawać soki kiszunkowe. Ich infiltracja powodowana jest zwykle niewłaściwie zabezpieczonym podłożem. Nadmierne nawożenie pól uprawnych nawozami mineralnymi i organicznymi to kolejne źródło zanieczyszczania wód. Nie można również pominąć emisji gazów i pyłów pochodzących z gospodarstw domowych. Zawarte w nich toksyczne związki przenoszone są do wód podziemnych wraz z opadami atmosferycznymi. Do gleby, a następnie do zasobów wód podziemnych, mogą się także przedostawać odcieki z terenów hodowlanych (zagrody, wybiegi dla zwierząt), a także ze składowisk odpadów [1,3]. Według Kodeksu Dobrej Praktyki Rolniczej [4], źródła zanieczyszczeń wód dzielone są na rolnicze i pozarolnicze. W przypadku rolniczych wyróżnia się źródła punktowe (np. zagroda wiejska, wysypisko śmieci, nieszczelna instalacja sanitarna, składowisko odchodów zwierzęcych), oraz obszarowe (np. użytki rolne).

Tabela1. Przeciętne normy zużycia wody w fermach i obiektach inwentarskich

Lp	Zwierzęta	Jednostka odniesienia (j.o.)	Przeciętne normy zużycia wody	
			obiekty inwentarskie drobnotowarowe dm ³ /j.o.*dobę	m ³ /miesiąc
1	2	3	4	5
1	Konie	1 zwierzę	50,0	1,50
	Żrebięta	1 zwierzę	30,0	0,90
2	Krowy			
	a) mleczne i sztuki wyrośnięte	1 zwierzę	70,0	2,10
	b) bydło mleczne (do 1,5 roku)	1 zwierzę	35,0	1,00
	c) jałówki i bukaty powyżej 1,5 roku	1 zwierzę	40,0	1,20
	d) buhaje	1 zwierzę	80,0	2,40
3	Drób			
	a) brojlery	1 ptak	0,3	0,01
	b) kury	1 ptak	1,0	0,03
	c) kaczki	1 ptak	11,0	0,33
	d) gęsi	1 ptak	17,0	0,51
	e) indyczki	1 ptak	2,0	0,06

Zródło: opracowanie własne na podstawie rozporządzenia Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody

Jak już wspomniano wcześniej, wody na obszarach wiejskich narażone są na szereg zanieczyszczeń. Osiągnięcie poprawy jakości tych wód nie jest zatem sprawą prostą. Utrudnia to między innymi wzrost obszarów utwardzonych oraz wzrost ilości nieoczyszczonych ścieków

burzowych. Oprócz tego, coraz więcej wsi korzysta z zasobów wód wodociągowych (ok. 80%), lecz większość z nich nie posiada jeszcze sprawnej kanalizacji (ok. 24%), przez co nieoczyszczone ścieki trafiają do wód i gleby. Na terenach wiejskich można zaobserwować także rozwój przemysłu i transportu, w wyniku którego wzrasta ładunek zanieczyszczeń liniowych. Podsumowując, wraz z rozwojem wsi, wzrasta ilość substancji szkodliwych dla środowiska, co w rezultacie powoduje zwiększenie zanieczyszczeń wód [1]. Tworząc program ochrony wód na terenach wiejskich należy zapoznać się z Kodeksem Dobrej Praktyki Rolniczej, który zawiera wykaz działań jakie należy wykonać, aby ograniczyć zanieczyszczenia punktowe i obszarowe.

Należy również zaznaczyć, że znaczna część wód naturalnych, z których korzysta człowiek, jest zazwyczaj zanieczyszczona różnego rodzaju bakteriami. Według Ciebiady – Adamiec [5], można ocenić stopień zanieczyszczenia wód biorąc pod uwagę liczbę bakterii w nich zawartych (Tabela 2.).

Tabela 2. Stopień zanieczyszczeń wód naturalnych

Liczba komórek bakterii w 1 cm ³ wody		Stopień zanieczyszczenia wody
zalecana	maksymalna	
≤ 200	500	bardzo czyste
≤ 5 000	10 000	czyste
≤ 25 000	100 000	średnio zanieczyszczone
≤ 1 000 000	2 000 000	silnie zanieczyszczone

Źródło: opracowanie własne na podstawie Ciebiady – Adamiec, 2008.

3. Studnia - jako rodzaj ujęcia wód podziemnych

Studnia, jest to rodzaj ujęcia wody podziemnej. W większości przypadków stosowane są studnie pionowe choć zdarzają się także skośne czy też kierunkowe. Może to być otwór kopany, czy też wiercony, którego zasięg rozpoczyna się od powierzchni terenu, a kończy na poziomie wodonośnym. Działanie studni uzależnione jest od wielu urządzeń technicznych (np. pompy), służących do trwałego poboru lub chłonięcia wody. Istnieje wiele podziałów studni w zależności od parametrów. Jednym z wyznaczników do podziału może być rozmiar pionowy, dzięki któremu wyróżnia się studnie: płytkie (umownie do 25-30 m) i głębokie. Ze względu na rozmiar poziomy, dzieli się je na: małosrednicowe (do 0,5 m) i wielkosrednicowe. Innym kryterium podziału może być sposób wykonania studni, czy też jej konstrukcja (studnie: kopane, szybowe, wiercone oraz wbijane, wkręcane, płytkie, z obudową, bez obudowy, filtrowe i bezfiltrowe) [6].

Ze względu na temat pracy, dalsza charakterystyka dotyczyć będzie jednego typu studni, a mianowicie studni kopanych.

3.1. Studnie kopane

Studnie kopane ujmują zwykle pierwszy poziom wodonośny (od którego właśnie uzależniona jest głębokość studni), czy też nieduże przewarstwienia piaszczyste wśród glin zwałowych, nie posiadających dużej głębokości. Średnice studni kopanych zazwyczaj są większe niż 0,75 – 1 m, głębokość zaś, waha się w przedziale od kilku do kilkunastu metrów. Ich wydajność jest zazwyczaj niewielka, aczkolwiek może wystarczać na zaspokojenie potrzeb niewielkich gospodarstw.

W aspekcie ich budowy przewidywane są dwa rozwiązania. Pierwszym z nich są kręgi betonowe (instalowane w luźnych utworach glebowych), drugim jest bezpośrednie wykuwanie studni w skałach szczelinowatych. W przypadku studni wykonywanych z kręgów betonowych - cembrowin, w celu uniknięcia zamulenia studni, a także stworzenia lepszych warunków dopływu wody stosuje się zasypkę. Jest to warstwa stworzona z gruboziarnistego materiału filtrującego, pokrywająca dno, przez które woda przedostaje się do studni. Niezbędnym elementem każdej studni jest pokrywa bądź zamykana obudowa, która zabezpiecza zasoby wodne studni przed czynnikami zewnętrznymi takimi jak śmieci czy liście [7].

Wody z tego typu studni, ujmowane są poprzez żurawie, chociaż w obecnych czasach odchodzi się od tego tradycyjnego sposobu na rzecz hydroforów. Jeżeli woda znajdująca się w studni przeznaczona jest do spożycia, należy pamiętać aby jej obudowa została wykonana z tworzywa niewpływającego negatywnie na jakość wody [8].

3.2. Warunki techniczne i usytuowanie studni

Podczas wykopywania studni, z których woda będzie przeznaczona do spożycia, należy zastosować się do zasad określonych w Rozporządzeniu Ministra Infrastruktury z 12 kwietnia 2002 r., w sprawie warunków technicznych, którym powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz. U., 2002, nr 75, poz. 690).

Po pierwsze, odległość studni od granicy nieruchomości, czy też studni wspólnej na granicy dwóch działek nie może być mniejsza niż 5 m. Jeżeli chodzi o odległość od osi rowu, nie może być mniejsza niż 7,5 metra, natomiast od budynków gospodarczych (inwentarskich),

a także często związanych z nimi różnego rodzaju zbiorników, urządzeń takich jak szczelne silosy, kompostowniki, odległość ta wynosi 15 m. W przypadku kanalizacji indywidualnej, a dokładnie najbliższego przewodu rozsączającego, który odprowadza ścieki oczyszczone biologicznie, jego odległość od studni musi osiągnąć co najmniej 30 m. Ostatni wymieniony w rozporządzeniu punkt, odnoszący się do odległości, związany jest z nieutwardzonymi wybiegami przeznaczonymi dla zwierząt hodowlanych, z przewodami rozsączającymi kanalizacji lokalnej, nieoczyszczających biologicznie ścieków oraz z granicą pola filtracyjnego. W wyżej wymienionych przypadkach, odległość studni dostarczającej wodę do spożycia przez ludzi, licząc od osi studni, nie powinna być mniejsza niż 70 m [9].

Rozporządzenie odnosi się także do obudowy studni kopanej. Musi ona być wykonana z tworzywa nieprzepuszczalnego, które zabezpieczy wodę przed niekorzystnymi czynnikami. Oprócz tego, cała konstrukcja studni musi być wykonana szczelnie. W przypadku studni kopanej, nieposiadającej urządzeń pompowych, została określona minimalna wysokość jej części nadziemnej, która wynosi 0,9 m od poziomu terenu. Oprócz tego wymagane jest nieprzepuszczalne przykrycie, chroniące urządzenia do poboru wody, a także wewnątrz studni. Jeżeli chodzi o studnie posiadające pompy, ich wysokość powinna mieć 0,2 m od poziomu terenu. Najbliższe otoczenie studni, a dokładnie pas o szerokości 1 m (od zewnątrz obudowy studni), powinien być utwardzony, a także skonstruowany w taki sposób aby osiągnąć spadek 2% w kierunku zewnętrznym [9].

4. Jakość wód podziemnych przeznaczonych do picia

Wody przeznaczone do picia powinny spełniać wymagania sanitarne regulowane przez Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.

Kontrole sanitarne wód przeznaczonych do spożycia są niezbędne. To dzięki nim, możemy wykryć istniejące zagrożenia, a przez to zapobiec chorobom, czy też epidemiom. Kontroli powinny być poddawane urządzenia służące do zaopatrywania w wodę. Oprócz tego należy badać wszelkie wskaźniki fizyczne, chemiczne jak i mikrobiologiczne wody [10].

Wśród mikrobiologicznych wskaźników jakości wody wyróżnia się: bakterie grupy *coli*, termotolerancyjne bakterie grupy *coli*, *Escherichia coli*, paciorkowce kałowe, bakterie z rodzaju *Clostridium* redukujące siarczany (IV), a także *colifagi* i inne wskaźniki alternatywne [11].

5. Metodyka badań

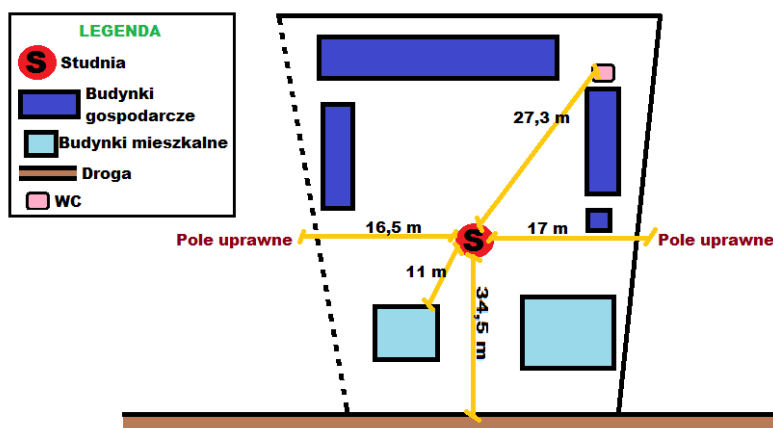
5.1. Charakterystyka miejsc poboru wody

Jakość wody zbadano w trzech studniach kopanych, znajdujących się we wsi Markowo, należącej do gminy Brańsk, w powiecie Bielsk Podlaski. Ponumerowano je kolejnymi cyframi rzymskimi I, II, III.

Studnia I zlokalizowana jest w obrębie działki numer 185. Jest to teren posesji, na której znajduje się dom jednorodzinny. Obok domu, znajdują się dodatkowo budynki gospodarcze, które aktualnie nie są wykorzystywane. W przeszłości siedlisko służyło hodowli zwierząt.

Woda ze studni aktualnie wykorzystywana jest na cele gospodarstwa domowego. Średnie dzienne zużycie to ok. 30 dm³. Działka znajduje się w zasięgu gleb brunatnych kwaśnych, mających kompleks żylny słaby. Warstwę wodonośną tworzą piaski. Na płytkiej głębokości do 50 cm podłoże tworzy piasek gliniasty lekki. Głębiej, od 50 do 100 cm zalega piasek słabogliniasty, pod którym występuje już tylko piasek luźny. Poza granicami działki rozciągają się tereny użytkowane rolniczo. Studnia nie posiada szczelnej pokrywy. Drewniana osłona zakrywa jedynie połowę otworu.

Na Rysunku 1. przedstawiono rozmieszczenie studni i pozostałych obiektów znajdujących się na terenie działki. Studnia znajduje się w odległości ok. 34,5 m od piaszczystej, mało ruchliwej drogi, a od domu mieszkalnego oddalona jest o 11 m. Dom nie posiada kanalizacji, a także podłączenia do sieci wodociągowej, brak w nim także łazienki i toalety. WC znajduje się na zewnątrz, w odległości ok. 27 m od studni. W obrębie działki wybudowane zostały cztery budynki gospodarcze (garaż, obora, stodoła, szopa na drewno), które obecnie nie są wykorzystywane (za wyjątkiem szopy). Poza granicami działki rozciągają się pola uprawne. Ich granice rozpoczynają się w odległościach ok. 16,5 m i 17 m od źródła wody.



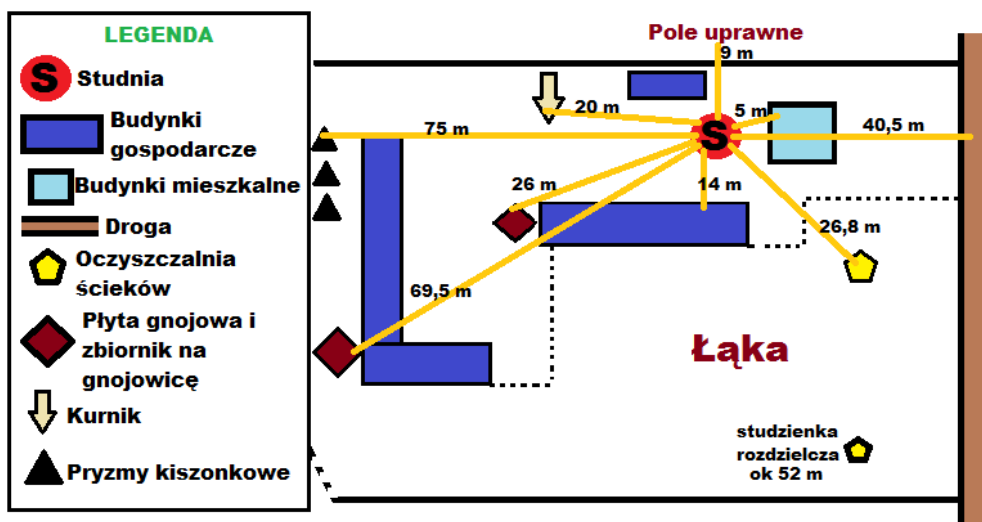
Rysunek 1. Układ studni nr I względem innych obiektów na działce

Źródło: Opracowanie własne

Studnia II wykopana została na działce numer 191/1. Jest to teren zabudowany, obszar gospodarstwa rolno – hodowlanego. Warstwę wodonośną tej działki tworzą piaski. Na płytkiej głębokości do 50 cm podłoże tworzy piasek gliniasty lekki. Głębiej, od 50 do 100 cm zalega piasek słabogliniasty, pod którym występuje już tylko piasek luźny. Woda ze studni czerpana jest do celów hodowlanych, głównie pojenia bydła. W pobliżu studni znajdują się budynki gospodarcze, w tym obory przeznaczone do hodowli bydła mlecznego. Łączna liczba stada, znajdującego się w obrębie działki, licząc od cieląt po krowy wynosi 70 sztuk. Na terenie gospodarstwa zlokalizowane jest szambo, płyty obornikowe, a także przyzmy kiszonkowe. Osłonę studni stanowi drewniana pokrywa, zabezpieczona dodatkowo warstwą blachy.

Studnia znajduje się w odległości ok. 5 m od domu mieszkalnego (Rysunek 2.). Dom ten przyłączony jest do sieci wodociągowej, a wytwarzane w nim ścieki kierowane są do przydomowej oczyszczalni ścieków. Droga asfaltowa, znajdująca się przy granicy działki, oddalona jest od studni o ok. 40,5 m. Poprzedzona jest ona rowem o szerokości

ok. 1,5 m. W obrębie granic działki znajdują się również dwie obory, w których hodowane jest bydło. Przy tych obiektach zlokalizowane są płyty gnojowe a także zbiorniki na gnojowicę (miejsca składowania stałych i płynnych odchodów zwierzęcych). Ich odległości od studni to: 26 m i 69,5 m. Za jednym z budynków gospodarczych (stodołą) znajdują się trzy pryzmy kiszonkowe (pasza dla zwierząt), oddalone o ok. 75 m od studni. W odległości ok. 20 m znajduje się kolejny obiekt inwentarski – kurnik, natomiast dystans jaki dzieli studnię i sąsiednią działkę stanowiącą pole uprawne to 9 m. Gospodarstwo zaopatrzone jest, jak już wspomniano, w przydomową oczyszczalnię ścieków, której komora oczyszczania znajduje się w odległości ok 14,5 m od domu i 26,8 m od studni. Jest to mechaniczno – biologiczna oczyszczalnia ścieków pracująca na niskoobciążonym osadzie czynnym. Ścieki oczyszczone odprowadzane są do gruntu przy pomocy drenażu usytuowanego na terenie działki. Odprowadzanie tych ścieków odbywa się przy pomocy zasilania elektrycznego, rozruchem technicznym i technologicznym.



Rysunek 2. Układ studni nr II względem innych obiektów na działce

Źródło: Opracowanie własne

Zasoby studni nr II przeznaczone są w głównej mierze do pojenia bydła i drobiu. Średnie dobowe zużycie wody ze studni zostało przedstawione w Tabeli 3. i określone na podstawie przeciętnych norm zużycia wody w fermach i obiektach inwentarskich, zamieszczonych w Rozporządzeniu Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody [2].

Tabela 3. Prawdopodobne zużycie wody ze studni nr II na cele hodowlane

Lp.	Zwierzęta	Sztuki zwierząt (j.o)	Przeciętne normy zużycia wody
			obiekty inwentarski drobnotowarowe $\text{dm}^3/\text{j.o.} \cdot \text{dobę}$
1	2	3	4
1	Krowy		
	a) bydło mleczne (do 1,5 roku)	13	455,0
	b) jałówki i bukaty powyżej 1,5 roku	19	760,0
2	Drób		
	b) kury	2	2,0
	c) kaczki	8	88,0
		SUMA	1305,0

Źródło: Opracowanie własne na podstawie danych z rozporządzenia Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody

Oprócz pojenia bydła i drobiu, woda pozyskiwana ze studni przeznaczana jest na podlewanie warzyw w przydomowym ogródku, w okresie ich wegetacji. Okres ten to głównie miesiące letnie. Średnie dobowe zużycie wody na ten cel wynosi ok. 150 – 200 dm^3 . W okresie letnim obora została unowocześniona. Zainstalowano poidła, do których

doprowadzana jest woda pochodząca z wodociągu. Zmniejszyła się zatem ilość pobieranej wody ze studni.

Studnia III zlokalizowana jest na działce o numerze 17/3. Stanowi ona element małego gospodarstwa rolno – hodowlanego. Gospodarstwo jest jednak urozmaicone, bo prócz bydła mlecznego znajduje się tu także hodowla koni. Jest to teren zabudowany. W obrębie działki jest dom mieszkalny, obora a także budynki gospodarcze. W pobliżu obory znajdują się miejsca na składowanie odchodów zwierzęcych płynnych i stałych. Warstwę wodonośną tej działki tworzą gliny. Podłoże zalegające płytko (do 50 cm) to glina lekka. Głębiej występuje glina średnia.

Średnie dobowe zużycie wody ze studni nr III na cele hodowlane zostało przedstawione w Tabeli 4. i określone na podstawie przeciętnych norm zużycia wody w fermach i obiektach inwentarskich, zamieszczonych w rozporządzeniu Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002 r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody [2].

Tabela 4. Prawdopodobne zużycie wody ze studni nr III na cele hodowlane

Lp.	Zwierzęta	Sztuki zwierząt (j.o)	Przeciętne normy zużycia wody
			obiekty inwentarski drobnotowarowe $\text{dm}^3/\text{j.o.} \cdot \text{dobę}$
1	2	3	4
1	Konie	1	50,0
	Żrebięta	1	30,0
2	Krowy		

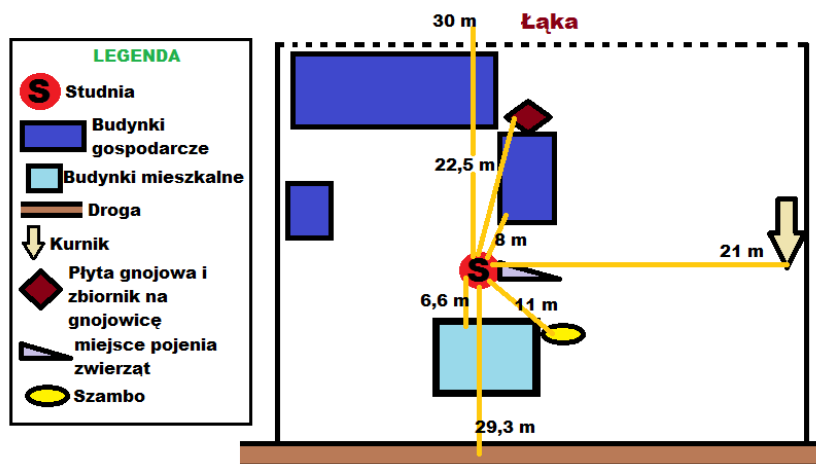
	a) mleczne i sztuki wyrośnięte	6	420,0
	b) bydło mleczne (do 1,5 roku)	4	140,0
3	Drób		
	a) kury	10	10,0
		SUMA	650,0

Źródło: Opracowanie własne na podstawie danych z rozporządzenia Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody

Oprócz pojenia zwierząt, woda pozyskiwana ze studni III przeznaczana jest również do nawadniania przydomowego ogródka, w okresie wegetacji sadzonych tam warzyw i owoców. Okres ten to głównie miesiące letnie. Średnie dobowe zużycie wody na ten cel wynosi ok. 350 – 400 dm³.

Schemat na Rysunku 3. przedstawia rozmieszczenie obiektów w obrębie działki, na której znajduje się studnia nr III. Studnia znajduje się w odległości ok. 29,3 m od drogi asfaltowej, 6,6 m od domu mieszkalnego i 11 m od miejsca odprowadzania ścieków komunalnych (szambo). Przy samej studni znajduje się zbiornik, do którego wlewana jest woda spożywana przez zwierzęta. Podłoże przy tym obiekcie nie jest w żaden sposób zabezpieczone, utwardzone. O ok. 8 m od studni oddalona jest obora, za którą znajduje się płyta gnojowa i zbiornik na gnojowicę (22,5 m). W obrębie działki znajduje się jeszcze jeden obiekt – kurnik, oddalony o ok. 21 m od źródła wody, a tuż poza granicą działki (30 m), znajduje się łąka.

Oslonę studni stanowi drewniana pokrywa. Dodatkowo nad kołowrotem służącym kiedyś do czerpania wody, znajduje się daszek, pokryty blachą.



Rysunek 3. Układ studni nr III względem innych obiektów na działce

Źródło: Opracowanie własne

Wszystkie wytypowane do badań studnie mają po osiem kręgów betonowych o średnicy 1 m. Wysokość każdego kręgu ma wymiar 0,8 m, a więc studnie mają głębokość do ok. 6,4 m.

Rzeczywista odległość w linii prostej między studnią I, a studnią II wynosi 335 metrów, natomiast pomiędzy studnią II a III 385 metrów.

Indywidualne studnie na terenie małych miejscowości, szczególnie wsi, są do tej pory wykorzystywane. Niektóre z nich są ciągle jedynym źródłem zaopatrzenia w wodę. Woda to cenny dar, ale czy z każdego ujęcia nadaje się ona do spożycia? To pytanie powinno pojawiać się w głowach właścicieli, którzy mają obowiązek zadbać o swoje źródła wody pitnej. Odpowiedź na to pytanie można uzyskać przeprowadzając odpowiednie badania laboratoryjne.

Niniejsza praca miała na celu przeprowadzenie badań stanu sanitarnego wód pochodzących z trzech studni kopanych znajdujących się na terenie wsi Markowo. Aby woda mogła uzyskać status czystej pod względem sanitarnym i mogła być bezpieczna dla spożywających ją ludzi, musi odpowiadać normom zawartym w Rozporządzeniu

Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Podstawowe wymagania mikrobiologiczne jakim powinna odpowiadać woda do spożycia, zawarte w Załączniku 1 powyższego Rozporządzenia to:

- *Escherichia coli* – najwyższa dopuszczalna wartość mikroorganizmów w 100 cm³ próbki wody to **0 JTK**
- enterokoki - najwyższa dopuszczalna wartość mikroorganizmów w 100 cm³ próbki wody to **0 JTK**[10].

5.2. Wykonywane oznaczenia

Prowadząc badania mikrobiologiczne wód studziennych wykonywano następujące oznaczenia:

- ogólna liczba bakterii metodą posiewu powierzchniowego na płytkach z podłożem agarowym;
- bakterie grupy *colitypu* ogólnego i termotolerancyjnego metodą fermentacyjną probówkową, systemem dwu probówkowym;
- paciorkowce kałowe metodą probówkową na płynnej pożywce z azydkiem sodowym systemem trój probówkowym.

Do oznaczania ogólnej liczby bakterii wykorzystywano stałe podłoże agarowe firmy BIOCORP, do oznaczania liczby bakterii grupy *coli* używano gotowego podłoża Eijkmanarównież firmy BIOCORP, natomiast do oznaczanie liczby paciorkowców kałowych używano samodzielnie wykonywanego podłoża zawierającego w swym składzie azydek sodowy. Do sporządzenia rozcieńczeń badanych wód przygotowywano płyn fizjologiczny.

6. Wyniki badań i dyskusja

Badania stanu sanitarnego wód w przydomowych studniach przeprowadzono w okresie trzech pór roku: wiosną, latem i jesienią. Wiosną badano w wodach obecność termotolerancyjnych bakterii grupy *coli*, a także obecność paciorkowców kałowych. Latem i jesienią wykonano dodatkowo oznaczenie: bakterii grupy *coli*, posiadających zdolność do fermentacji laktozy w temperaturze 37°C, czyli bakterii grupy *coli* typu ogólnego, a także oznaczenie ogólnej liczby bakterii. Badania zakończyły się określeniem najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) bakterii grupy *coli* (obu typów) w 100 cm³, NPL paciorkowców kałowych w 100 cm³, a także ogólnej liczby bakterii w 1 cm³ badanej próbki wody.

Tabela 5. zawiera wyniki oznaczania ogólnej liczby bakterii dla wód z trzech studni, otrzymane latem i jesienią.

Tabela 5. Zestawienie wyników oznaczania ogólnej liczby bakterii

Numer studni	Liczba bakterii w 1cm ³ wody	
	Lato	Jesień
I	1010	910
II	640	970
III	22000	1370

Źródło: Opracowanie własne

Zgodnie z klasyfikacją wód naturalnych podaną przez Ciebiadę – Adamiec [5], zamieszczoną w rozdziale 2.1. wodę w studniach I i II zarówno latem jak i jesienią oraz wodę ze studni III jesienią można uznać za czystą. Jedynie latem wody studni III zaliczyć należy do wód średnio zanieczyszczonych. Na gorszy stan wody ze studni III mogło wpłynąć

niekorzystne usytuowanie tej studni. W jej najbliższym otoczeniu znajduje się niezabezpieczony wybieg dla zwierząt, a także nieszczelny zbiornik na ścieki komunalne. Oprócz tego, możliwym źródłem bakterii w wodzie tej studni może okazać się drewniana pokrywa. Mikroorganizmy żyjące w starym, spróchniałym drewnie mogą być przenoszone do wody studziennej wraz z przesiakającymi przez pokrywę opadami atmosferycznymi. Podczas oznaczeń wykonywanych jesienią, na wynik mógł również wpłynąć fakt iż poziom wody w studni, w czasie poboru próbki, był zanikający. Próbkę wody pobrano zatem z warstwy pozostającej w bezpośrednim kontakcie z glebą. Do wody mogły się przedostać bakterie występujące w glebie.

Na liczbę bakterii mogły mieć również wpływ zabiegi pielęgnacyjne wykonywane wiosną i wczesnym latem na polach uprawnych, sąsiadujących z posesją, na której znajduje się studnia. Zanieczyszczenia będące rezultatami tych prac mogły się przedostać do wody studziennej. Prawdopodobnie przedostawały się one wraz z opadami atmosferycznymi do gruntu, a następnie infiltrowały do zasobów studni.

Tabela 6. zawiera wyniki oznaczania bakterii grupy *coli* typu ogólnego w wodach z trzech studni, uzyskane latem i jesienią.

Tabela 6. Zestawienie wyników oznaczania bakterii grupy *coli* typu ogólnego

Numer studni	NPL bakterii w 100 cm ³			Miano bakterii		
	Wiosna	Lato	Jesień	Wiosna	Lato	Jesień
I	nie badano	6200	2300	nie badano	0,02	0,04
II	nie badano	23	1300	nie badano	4	0,08
III	nie badano	6200	620	nie badano	0,02	0,2

Źródło: opracowanie własne

Badania obecności bakterii grupy *coli* typu ogólnego przeprowadzone latem i jesienią wykazały, że latem w próbkach wody ze studni nr I i III otrzymano największe wartości NPL tego typu bakterii w 100 cm³ wody. Prawdopodobną przyczyną jaka mogła wpłynąć na stan sanitarny wody w studni nr I jest ewentualne przedostanie się ścieków bytowo – gospodarczych pochodzących z domu. Jest to jedyne przypuszczalne źródło gdyż nie jest wiadomym gdzie usuwane są ścieki z tego gospodarstwa domowego. Brak w nim kanalizacji. Oprócz tego, do ilości bakterii jakie wystąpiły w wodzie z tej studni mógł się przyczynić fakt, iż nie posiada ona odpowiedniej pokrywy, istniejąca zakrywa jedynie połowę osi kręgu, a dodatkowo wykonana jest z drewna. Poprzez niecałkowite zakrycie studni, do zwierciadła wody mogły docierać promienie słoneczne, przez co woda mogła się nagrzewać i stwarzać korzystniejsze warunki do utrzymywania się tego typu bakterii.

Jeżeli chodzi o studnię nr III, tu możliwym źródłem bakterii są również ścieki gospodarcze. W tym przypadku potwierdzeniem tego stanu może być znajdujący się w pobliżu, niezabezpieczony, nieszczelny zbiornik na ścieki.

W wodzie ze studni nr II, latem, ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego była stosunkowo niska. Jesienią NPL bakterii w 100 cm³ wzrosła do 1300. Prawdopodobnie była to przyczyna zmniejszonych poborów wód. Woda mogła ulec zamuleniu, a według Wojtatowicz i in. [12], większa część bakterii przyłącza się do różnych cząstek (np. mułu), które znajdują się w wodzie, niż porusza się swobodnie po zbiorniku wodnym (w tym przypadku studni).

Tabela 7. zawiera wyniki oznaczania termotolerancyjnych bakterii grupy *coli* w wodach z trzech studni, z wszystkich pór roku.

Tabela 7. Zestawienie wyników oznaczania termotolerancyjnych bakterii grupy *coli*

Numer studni	NPL bakterii w 100 cm ³			Miano bakterii		
	Wiosna	Lato	Jesień	Wiosna	Lato	Jesień
I	23	62	23	4	2	4
II	23	<5	230	4	>20	0,4
III	23	6200	230	4	0,02	0,4

Źródło: Opracowanie własne

Wiosną, we wszystkich studniach odnotowano niewielkie ilości termotolerancyjnych bakterii grupy *coli*. Wartości NPL bakterii tego typu w 100 cm³ wynosiły 23. Wyniki otrzymane latem były już zróżnicowane. W I i III studni wartość NPL bakterii w 100 cm³ wody uległa wzrostowi. W wodzie nr I wzrost nie był duży, natomiast w wodzie nr III różnica była znacząca. Przyczyną tak dużego wzrostu mogło być częstsze pojenie zwierząt. W okresie letnim zwierzęta mają większe pragnienie. Miejsce pojenia zwierząt w tym gospodarstwie znajduje się tuż przy studni. Zwierzęta często wypróżniają się w jej obrębie, a jak wiadomo odchody są jednym ze źródeł bakterii grupy *coli*. Wokół studni brak jest utwardzonego pasa, zabezpieczenia podłoża co sprzyja przedostawaniu się tych bakterii do wody. Oprócz tego, w pobliżu studni znajduje się nieszczelny zbiornik na ścieki komunalne. Okres letni przyczynia się również do zwiększonej produkcji ścieków, które mogą przedostawać się do wody studziennej. Jedynie w wodzie ze studni nr II bakterii grupy *coli* nie wykryto (podano jedynie górną granicę przedziału dla NPL i dolną dla miana, określoną według normy PN-75-04615/05 [13]). W najbliższym otoczeniu studni nie stwierdzono źródeł zagrożeń, które bezpośrednio wpłynęłyby na stan sanitarny wody. Jesienne wartości wyników oznaczeń termotolerancyjnych bakterii grupy *coli* były

stosunkowo niskie. W I i III próbkę wody NPL bakterii w 100 cm³ uległa zmniejszeniu w porównaniu do lata. Jedynie w wodzie ze studni nr II NPL bakterii wzrosła.

Jeżeli chodzi o zmiany liczebności tych bakterii w 100 cm³, w poszczególnych wodach studziennych na przełomie analizowanych pół roku, sytuacja wyglądała następująco:

- w wodzie ze studni nr I mniejsze ilości bakterii odnotowano wiosną i jesienią (NPL = 23 w 100 cm³ wody), natomiast latem, ilość ta uległa zwiększeniu (NPL = 62 w 100 cm³ wody);
- w wodzie ze studni nr II, wiosną NPL wyniosła 23, latem nie wykryto tego typu bakterii natomiast jesienią nastąpił wzrost bakterii w próbce wody do NPL = 230 w 100 cm³ wody;
- wiosną w wodzie ze studni nr III, wartość NPL bakterii w 100 cm³ wyniosła 23, latem wzrosła do 6200, po czym jesienią nastąpił spadek do 230.

Tabela 8. zawiera wyniki oznaczania paciorkowców kałowych, dla wód z trzech studni, w trzech porach roku.

Tabela 8. Zestawienie wyników oznaczania paciorkowców kałowych

Numer studni	NPL bakterii w 100 cm ³			Miano bakterii		
	Wiosna	Lato	Jesień	Wiosna	Lato	Jesień
I	4	230	23	25	0,4	4
II	<3	<3	9	>33	>33	11
III	23	930	43	4	0,1	2

Źródło: opracowanie własne

Paciorkowce kałowe występują w odchodach zarówno ludzkich jak i zwierzęcych. Wyniki oznaczeń wykonywanych wiosną wykazują

stosunkowo niskie NPL bakterii w 100 cm³ wody. Co więcej, w wodzie ze studni nr II, przyjętym trójpróbówkowym systemem posiewu paciorkowców kałowych nie wykryto (podano jedynie górną granicę przedziału dla NPL i dolną dla miana, określoną według odpowiedniej normy [14]). Stan ten utrzymywał się także podczas badań wykonywanych latem. Niewielkie ilości tych bakterii w wodzie ze studni nr II odnotowano jedynie jesienią.

Latem, w wodzie ze studni nr III wykryto największą liczbę tych bakterii. Prawdopodobną przyczyną nagromadzenia paciorkowców kałowych w tej wodzie jest zbyt bliskie występowanie miejsca odpływu ścieków pochodzących z domu. Innym źródłem mogą być również odchody zwierząt pojoych tuż przy studni.

Jeżeli chodzi o przyczynę wystąpienia sporej liczby paciorkowców w wodzie ze studni nr I latem, (wartość NPL bakterii w 100 cm³ 230), wykluczyć można odchody zwierzęce, gdyż na terenie tej posesji nie występuje żadna hodowla. Jak już wspomniano wcześniej, dom na tej działce nie posiada podłączenia do sieci wodociągowej. Nie ma w nim również łazienki ani systemu kanalizacyjnego. Rolę toalety pełni WC znajdujący się na tej posesji. Odległość od miejsca jego usytuowania do studni teoretycznie jest odpowiednia, ale nie jest pewne, że jest to jedyne miejsce występowania odchodów, czy też ścieków bytowo gospodarczych.

Podsumowując wykonane badania stwierdzono, że najlepsze wyniki odnotowano dla wody ze studni nr II. Latem, w tej wodzie nie wykryto termotolerancyjnych bakterii grupy *coli*, natomiast latem i jesienią nie wykryto także paciorkowców kałowych. Można by rzec, że jest to najczystsza wśród badanych wód. Mimo że latem nie wykryto

w niej enterokoków ani termotolerancyjnych bakterii grupy *coli*, nie spełnia ona jednak (jak również obie pozostałe wody) wymogów stawianych wodzie przeznaczonej do spożycia, zawartych w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [10]. Pozostałe dwa parametry nie osiągnęły zadawalającego wyniku. Jeżeli chodzi o usytuowanie studni, a dokładnie o odległość studni dostarczającej wodę do spożycia przez ludzi, do najbliższego przewodu rozsączającego kanalizacji indywidualnej oczyszczającej ścieki biologicznie, we wszystkich przypadkach jest ona mniejsza niż odległość żądana podana w Rozporządzeniu Ministra Infrastruktury z 12 kwietnia 2002 r., w sprawie warunków technicznych, którym powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie. Niezgodne z wymogami powyższego Rozporządzenia jest także zagospodarowanie terenu otaczającego studnię kopaną [9].

W przypadku studni nr II nie utwardzono nawierzchni bezpośrednio przylegającej do jej zewnętrznej ściany. To właśnie te zaniechania mogły okazać się przyczyną złych wyników oznaczeń.

Jeżeli chodzi o wyniki najmniej korzystne, w większości przypadków uzyskiwano je dla wody ze studni nr III. Powodem złych wyników mogło okazać się nieodpowiednie usytuowanie studni względem innych obiektów, a także drewniana pokrywa studni. W przypadku studni nr I, głównym zagrożeniem dla wody mogła okazać się nieodpowiednia pokrywa studni. Na niekorzystną jakość sanitarną wody może mieć również wpływ sposób poboru wody. W tym przypadku woda czerpana jest ręcznie przy pomocy wiadra, które nie raz może mieć kontakt z podłożem czy też starą pokrywą, na których mogą bytować

różnego rodzaju mikroorganizmy, często zagrażające zdrowiu człowieka. Należy również wspomnieć, że ilość pobieranej z tej studni wody, w przeciągu doby, jest stosunkowo mała, co również może negatywnie wpływać na stan wody.

Większość najgorszych, odnotowanych wyników miała miejsce latem. Przyczyną tego stanu mogą być bardziej intensywne spływy z pól uprawnych występujące o tej porze roku. Może to być również wynik wysokich temperatur, bardziej zbliżonych do optymalnych dla oznaczanych drobnoustrojów. Jednakże nie wolno zapominać o hodowli zwierząt. To właśnie w okresie letnim było wypuszczane jest na wybiegi, pastwiska, przez co bakterie są szerzej rozprzestrzeniane w obrębie gospodarstw.

Analizowane wyniki porównano do wyników badań mikrobiologicznych otrzymanych podczas oceny stopnia zanieczyszczenia wód w wybranych studniach kopanych na terenie Narwiańskiego Parku Narodowego [15], podczas których oznaczano NPL bakterii grupy *coli* w 100 cm³, NPL bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego w 100 cm³, NPL enterokoków w 100 cm³, a także ogólną liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych w 1 cm³ wody. W badanych wodach, pochodzących z 6 studni odnotowywano różne liczebności obu typów bakterii grupy *coli*, a także paciorkowców kałowych. Tylko w przypadku jednej z wód studziennych, w przeciągu wszystkich serii badawczych nie wykryto obecności bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego. Wystąpiły jednak przekroczenia norm pozostałych parametrów, które powodowały, że woda uzyskiwała status niezdatnej do spożycia. Podsumowując, stwierdzono, że w obu przypadkach, we wszystkich studniach stan sanitarny wód można określić

jako zły. Zostały przekroczone normy stawiane wodzie przeznaczonej do spożycia. Woda w ocenianych studniach, jak stwierdzono, nie nadaje się do spożywania przez ludzi. Jest to cenny dar Ziemi, którego zasoby należy racjonalnie wykorzystywać, dlatego warto byłoby przeprowadzić badania, które ukazałyby czy nadaje się ona do spożywania dla zwierząt. Są to stworzenia o mniej wymagającym układzie pokarmowym, więc może dla ich organizmów, stan sanitarny wody nie będzie stwarzał większego zagrożenia.

7. Wnioski

1. Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wody z wybranych studni w miejscowości Markowo wykazały ich niezadowalającą jakość.
2. W wodach ze wszystkich studni wykrywano zarówno bakterie grupy *coli* obu typów jak i paciorkowce kałowe. Mikroorganizmy te nie powinny być wykrywalne w 100 cm³ wody pitnej.
3. Najlepszą jakością wody odznacza się studnia nr II, wokół której nie zlokalizowano istotnego źródła zagrożenia. Wiosną i latem nie wykryto w niej paciorkowców kałowych, a latem dodatkowo termotolerancyjnych bakterii grupy *coli*.
4. Stwierdzono niewłaściwą lokalizację studni względem budynków gospodarczych i składowisk odchodów zwierzęcych, a także miejsc odprowadzania ścieków bytowo – gospodarczych, która może mieć wpływ na jakość wody.
5. Istotny wpływ na jakość badanych wód ma głębokość studni. Są to studnie stosunkowo płytkie, a więc ich wody są bardziej narażone na skażenie.
6. W celu poprawy jakości wody w studniach właściciele powinni:

- dbać o najbliższe otoczenie studni,
 - w przypadku budowy studni z kręgów betonowych, pamiętać o ich spoinowaniu, w celu zapobiegania przedostaniu się zanieczyszczeń z gleby,
 - zabezpieczyć studnię solidną, nieprzepuszczalną pokrywą, w celu uniknięcia przedostawania się zanieczyszczeń z powietrza,
 - zaopatrzyć studnię w urządzenia pompujące wodę, w celu zaprzestania poboru wody przy pomocy wiader,
 - przeprowadzać okresowe badania kontrolne wody ze studni,
 - przeprowadzić dezynfekcję wody, w przypadku jej złych parametrów.
7. Jeżeli wszystkie powyższe wymagania zostały zastosowane, a woda w studni kopanej nadal nie spełnia żądanych oczekiwań, należałoby pomyśleć o jej pogłębieniu, co może przynieść pozytywny skutek.

Literatura:

1. Koc J.: *Gospodarowanie wodą w rolnictwie*, [w:] *Ochrona zasobów i jakości wody w krajobrazie wiejskim*: Monografia pod red. Koc J. Katedra Melioracji i Kształtowania Środowiska, Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, 2010, rozdz. 1, rozdz. 4.
2. Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 14 stycznia 2002r. w sprawie określenia przeciętnych norm zużycia wody (Dz.U. 2002 nr 8 poz. 70).
3. Biedrawa – Kozik A., Gliniak M., Kępys W., Kowalska A., Łyko P., Pawul M., Pomykała R., Sobczyk W., Szymańska – Czaja M., Śliwka M.: *Wybrane zagadnienia ochrony i inżynierii środowiska*. Wydawnictwa AGH, Kraków, 2014, str. 30- 32.

4. Kodeks dobrej praktyki rolniczej, 2004.
5. Ciebiada – Adamiec A.: *Mikrobiologia żywności, wody, gleby, powietrza i leków*. Uniwersytet medyczny w Łodzi, Łódź, 2008, rozdz. 4.
6. Dowgiałło J., Kleczkowski A. S., Macioszczyk T., Rózkowski A. (red.): *Słownik hydrogeologiczny*. Państwowy Instytut geologiczny, Warszawa, 2002.
7. Mikołajków J. *Ujęcia wód podziemnych*, [w:] *Podstawy hydrogeologii stosowanej*: pod red. Macioszczyk A. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006, rozdz.1, str. 29 – 38, rozdz.14, str. 334 – 342.
8. Macias A., Bródka S.: *Przyrodnicze podstawy gospodarowania przestrzenią*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2014, str. 217 – 234.
9. Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z 12 kwietnia 2002r., w sprawie warunków technicznych, którym powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz. U., 2002, nr 75, poz.690).
10. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. 2015r. poz. 1989).
11. Grabińska – Łoniewska A., Siński E.: *Mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze w ekosystemach wodnych i sieciach wodociągowych*. Wydawnictwo „Seidel - Przywecki” Sp. z o. o., Warszawa, 2010, rozdz.2.
12. Wojtatowicz M., Stempniewicz R., Żarowska B., Rymowicz W., Robak M.: *Mikrobiologia ogólna*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, 2008, str. 101 – 109.
13. PN-75-04615/05 Oznaczanie liczby bakterii grupy coli.

14. PN-C-04615-25:1982 Oznaczanie paciorkowców kałowych.
15. Butarewicz A., Szczukowska J. *Ocena stopnia zanieczyszczenia wód w wybranych studniach indywidualnych zlokalizowanych na terenie Narwiańskiego Parku Narodowego*, [w:] *Zaopatrzenie w wodę, jakość i ochrona wód*: pod red. Elektorowicz M., Sozański M. M. tom I, Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, Poznań, 2004, str. 257 – 266.

mgr inż. Sebastian Niestępski¹⁾, mgr inż. Adriana Osińska,
inż. Ewa Amenda, Monika Hubacz
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk o środowisku
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn
¹⁾niestepski.sebastian@gmail.com

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza oraz powierzchni płaskich w pomieszczeniach użyteczności publicznej

Microbial contamination of air and flat surfaces in public spaces

Słowa kluczowe: *jakość powietrza pomieszczeń, zanieczyszczenie powierzchni płaskich, bioaerozol*

Keywords: *quality of indoor air, pollution of flat surfaces, bioaerosols*

Streszczenie: Czystość środowiska istotnie wpływa na stan zdrowia ludzi w nim przebywających. Monitoring jakości mikrobiologicznej powietrza oraz powierzchni, z którymi człowiek styka się na co dzień, może poprawić komfort życia oraz zmniejszyć zachorowalność na schorzenia wywołane mikroorganizmami chorobotwórczymi.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza oraz powierzchni płaskich w pomieszczeniach Katedry Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Powietrze badano metodą zderzeniową w czterech punktach poboru zlokalizowanych w budynku Katedry Mikrobiologii Środowiskowej oraz przed budynkiem, w celu porównania jakości powietrza pomieszczeń oraz zewnętrznego. Próbkę powietrza pobrano za pomocą próbnika MAS-100 Eco firmy MERCK. W próbkach powietrza określono ogólną liczbę bakterii i grzybów, liczebność gronkowców hemolizujących i gronkowców mannitolododatnich oraz promieniowców.

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powierzchni płaskich zostało zbadane metodą wymazów z powierzchni określonej szablonem. Analiza obejmowała różne

powierzchnie użytkowe badanych pomieszczeń. W próbkach oznaczano ogólną liczbę bakterii i grzybów, liczbę bakterii z grupy coli, pałeczek okrężnicy oraz gronkowców.

Największe zanieczyszczenie powietrza stwierdzono na stanowisku usytuowanym przed Katedrą Mikrobiologii Środowiskowej. Wg polskich norm powietrze w laboratorium nr 2 i w toalecie zostało ocenione jako silnie zanieczyszczone. Natomiast najbardziej zanieczyszczoną powierzchnią była podłoga w laboratorium.

Prowadzenie monitoringu mikrobiologicznego środowiska pracy umożliwia szybkie reagowanie na jego zanieczyszczenie drobnoustrojami, zwiększając bezpieczeństwo zdrowotne ludzi.

1. Wstęp

Środowisko bytowania ludzi wywiera istotny wpływ na zdrowie i komfort życia człowieka. Do podstawowych czynników wpływających na ludzi należą jakość powietrza [1] oraz czystość powierzchni użytkowych w pomieszczeniach, w których codzienne spędzają dużo czasu, np. pomieszczenia biurowe.

1.1. Powietrze

Powietrze jest dla drobnoustrojów środowiskiem niesprzyjającym, w którym nie mają warunków do życia i namnażania się. Stanowi ono jedynie miejsce ich okresowego występowania, umożliwiające przemieszczanie się, np. poprzez ruchy powietrza [2]. Pomimo tego, liczebność mikroorganizmów w powietrzu jest zazwyczaj wysoka. Mikrobiotę powietrza tworzą najczęściej ziarniaki z rodzaju *Micrococcussp.*, *Sarcinasp.* oraz *Staphylococcussp.*, oraz przetrwalniki bakterii np.: *Bacillussp.*, a także promieniowce, zarodniki grzybów strzępkowych np.: z rodzajów *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium* czy drożdże z rodzajów *Rhodotorula*, *Candida*. W pomieszczeniach zamkniętych, charakteryzujących się dużym zagęszczeniem ludzi, liczba

drobnoustrojów może być znacznie większa niż w miejscach otwartych. W powietrzu wewnętrznym znajduje się duża liczba mikroorganizmów chorobotwórczych wydalanych przez ludzi wraz ze śliną podczaskichaniaczy kasłania [3]. Istnieje wiele doniesień wykazujących, że mikroorganizmy występujące w powietrzu mogą przyczyniać się do infekcji, chorób immunotoksycznych i alergii [4–6]. Z tego powodu, problem jakości mikrobiologicznej powietrza w pomieszczeniach użyteczności publicznej, czy też miejsca pracy, jest obecnie przedmiotem zainteresowania wielu naukowców [7-8]. W Polsce powietrze atmosferyczne do 25.08.2015r. podlegało ocenie pod względem zanieczyszczenia mikrobiologicznego opartej na normach - PN-89 Z-0411/02 oraz PN-89 Z-0411/03 [9-10]. Normy prawne dzieliły je na niezanieczyszczone, średnio zanieczyszczone oraz silnie zanieczyszczone (Tabela 1). Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego jest związany ze zwiększającą się ilością drobnoustrojów wskaźnikowych zawartych w 1m^3 . Ze względu na brak nowych norm mikrobiologicznej jakości powietrza w Polsce, wyniki czystości powietrza w niniejszej pracy zostały odniesione do wycofanych norm PN-89 Z-0411/02 oraz PN-89 Z-0411/03.

Tabela 1. Ocena stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego dla bakterii i grzybów wg PN-89 Z-0411/02 i 03

Stopień zanieczyszczenia	Nie zanieczyszczone	Średnio zanieczyszczone	Silnie zanieczyszczone
Ogólna liczba bakterii	<1000	1000-3000	>3000

Liczba promieniowców		<10	10-100	>100
Liczba gronkowców hemolizujących	α	brak	<25	>25
	β	brak	<50	>50
Liczba grzybów		<5000	5000-10000	>10000

Źródło:[9-10]

1.1.1. Pobieranie próbek powietrza

Badanie powietrza pod względem występowania mikroorganizmów prowadzi się głównie dwoma sposobami – metodą sedymentacyjną oraz zderzeniową. Obie te metody mają swoje wady i zalety, ale metoda zderzeniowa uważana jest za bardziej dokładną [11].

1.1.1.1. Metoda sedymentacyjna

Metoda ta opiera się na swobodnym opadaniu grawitacyjnym (sedymentacji) drobnoustrojów z powietrza na stałe podłoże hodowlane w określonym czasie w oznaczonym punkcie poboru na wysokości 1m. Obliczanie objętości powietrza w tej metodzie wykorzystuje założenia Omeliańskiego, mówiącego, iż w ciągu 5 min na 100 cm² powierzchni pożywki stałej sedymentują drobnoustroje zawarte w 10 dm³ powietrza. Oznaczając różne grupy mikroorganizmów stosuje się odpowiedni czas ekspozycji płytki z pożywką na powietrze atmosferyczne. Podczas wyznaczania ogólnej liczby bakterii i grzybów, płytki zostawia się otwarte przez 10 min, a płytki z pożywkami wybiórczymi na 30 min, a następnie zakrywa się je i inkubuje w odpowiednich warunkach [12]. Po określonym czasie inkubacji, liczbę bakterii oblicza się według wzoru Omelińskiego w modyfikacji Gogoberidze (1). Zaletą tej metody jest

prostota wykonania, a także fakt, że nie wymaga kosztownych urządzeń. Prócz ww. zalet, metoda sedymentacyjna posiada liczne wady. Metodą tą niemożliwe jest wykrycie mikroorganizmów stanowiących frakcję respirabilną (opadającą wolno lub wcale). Najważniejszą wadę metody stanowi niedokładność. Pomimo założenia Omeliańskiego, badana objętość powietrza jest tylko szacunkowa, zależna od wielu czynników, głównie ruchu powietrza [2].

$$X = \frac{5 \cdot 10^4 \cdot \bar{a}}{\pi \cdot r^2 \cdot 0,2 \cdot t'} \quad (1)$$

gdzie:

X – liczba organizmów w powietrzu [jtk/m³]

$\bar{a}$ – średnia liczba kolonii bakteryjnych na płytce

r – promień płytki Petriego [cm]

t – czas ekspozycji płytki [min]

$5 \cdot 10^4$ – współczynnik przeliczeniowy na 1 m³ powietrza.

Natomiast liczbę grzybów oblicza się wg wzoru:

$$X = \frac{\bar{a} \cdot 10^4}{\pi \cdot r^2 \cdot 0,2 \cdot t'} \quad (2)$$

gdzie:

X – liczba organizmów w powietrzu [jtk/m³]

$\bar{a}$ – średnia liczba kolonii grzybów na płytce

r – promień płytki Petriego [cm]

t' – czas ekspozycji płytki [min].

1.1.1.2. Metoda zderzeniowa

Metoda zderzeniowa (impakcyjna) polega na zasysaniu określonej objętości próbki powietrza przez szczeliny lub otwory urządzenia. Powietrze pobierane z dużą prędkością uderza w powierzchnię podłoża hodowlanego znajdującego się w mierniku. Następnie pożywkę poddaje się odpowiedniej inkubacji, po której zlicza się liczbę kolonii. Metoda impakcyjna jest najwyżej cenioną metodą wykrywania drobnoustrojów w powietrzu. Jej największym atutem jest możliwość wykrycia i określenia mikroorganizmów stanowiących frakcję respirabilną. Jest to istotne, zważywszy na fakt, że mniejsze cząstki mają większą zdolność do penetracji dróg oddechowych. Metoda ta nadaje się do badania powietrza w kierunku występowania wirusów (po odpowiedniej obróbce pozyskanego materiału biologicznego). Metoda ta posiada także wady. Największą z nich jest spadek żywotności mikroorganizmów w wyniku uderzenia z dużą prędkością o pożywkę, a także możliwość zarastania pożywek przy badaniu silnie zanieczyszczonego powietrza, w wyniku czego późniejsze zliczanie kolonii jest niemożliwe. Do wykonania oznaczenia mikroorganizmów tą metodą konieczne jest posiadanie kosztownego urządzenia do pobierania powietrza np. impaktor Andersena (Rysunek 1) czy impaktor MAS (Rysunek 2) [12].

Liczebność mikroorganizmów obecnych w 1m^3 powietrza obliczono według następującego wzoru:

$$X = \frac{\bar{a} \cdot 1000}{v} \quad (3)$$

gdzie:

X – liczba organizmów w powietrzu [jkt/m^3]

$\bar{a}$ – średnia ilość wyrosłych kolonii na płytce

V – objętość pobranego powietrza [m^3].



Rysunek 1. Impaktor Andersena

Źródło: [13]



Rysunek 2. Impaktor MAS (model 100Eco)

Źródło: [13]

1.2. Powierzchnie użytkowe

Drugim ważnym aspektem jakości mikrobiologicznej pomieszczeń są tzw. powierzchnie użytkowe. Tym terminem określa się każdą powierzchnię, z którą człowiek ma styczność tj. podłogę, blaty stołów czy nawet krzesła. Drobnoustroje na te powierzchnie dostają się różnymi drogami, głównie poprzez sedimentację z powietrza, a także zostają naniesione przez ludzi i zwierzęta. Powierzchnie użytkowe

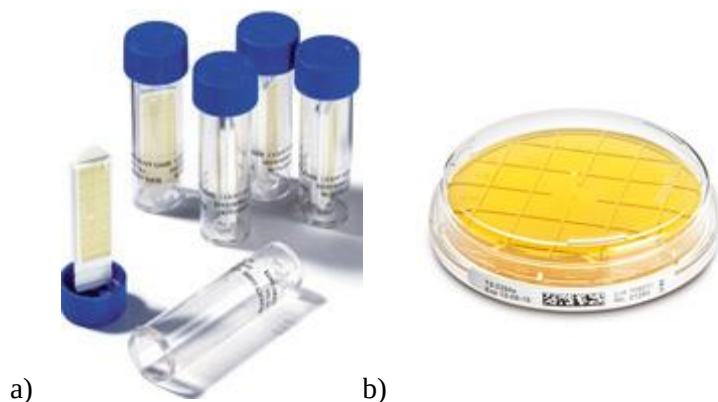
stanowią rezerwuarn drobnoustrojów m.in. potencjalnie zagrażających zdrowiu i życiu ludzi. Mikroorganizmy występujące na powierzchniach przedostają się na lub do człowieka najczęściej poprzez drogę: powierzchnia użytkowa – skóra człowieka (np. dłoni) – wrota infekcji. Wrotami infekcji są m.in. spojówki oka, jama ustna, śluzówka nosa.

1.2.1. Wyznaczanie mikroorganizmów występujących na powierzchniach

Najczęściej kontrola czystości powierzchni polega na wykonaniu oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, liczby pleśni i drożdży oraz obecności drobnoustrojów chorobotwórczych, takich jak *Salmonella* spp. Do mikrobiologicznej oceny czystości powierzchni stosuje się najczęściej metodę odciskową lub wymazową [14].

1.2.1.1. Metoda odciskowa

Metoda odciskowa polega na pobraniu próby za pomocą specjalnie przygotowanych płytek odciskowych, wypełnionych odpowiednim podłożem hodowlanym o menisku wypukłym (Rysunek 3). Metodę tę można stosować wyłącznie do oznaczania czystości mikrobiologicznej powierzchni gładkich i płaskich tj. linii produkcyjnych, blatów stołów.



Rysunek 3. Płytki odciskowe

Źródło: a) [15] b)[16]

W celu wykonania poboru materiału, powierzchnię płytki należy ostrożnie przycisnąć do badanej powierzchni i przytrzymać przez około 5-10 s, pamiętając by nie poruszać płytką na boki. Następnie po pobraniu próbki, płytki należy natychmiast szczelnie zamknąć. Do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów należy zastosować płytkę odciskową z podłożem TSA lub PCA, dla bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* agar VRBG, natomiast dla pleśni i drożdży podłoże Sabourauda z chloramfenikolem. Przy podejrzeniu obecności na badanej powierzchni środków myjących należy do zastosować podłoża z neutralizatorem. Na koniec płytki z podłożem inkubuje się w odpowiednich warunkach dla danej grupy drobnoustrojów [14]. Po zakończonej inkubacji oblicza się liczbę kolonii mikroorganizmów na płytkach, a wynik przedstawia w jednostkach jtk/10 cm² lub jtk/100 cm² (w zależności od powierzchni płytki odciskowej).

1.2.1.2. Metoda wymazów

Metoda wymazów polega na wykonaniu wymazu z badanej powierzchni. Metodę tę można zastosować do powierzchni płaskich lub

słabo wygiętych wydzielając pole badanej powierzchni 25 cm² lub 100 cm² odpowiednio przygotowanym szablonem. Można ją również stosować do oznaczania stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni trudno dostępnych, zakrzywionych lub wilgotnych, czyli takich gdzie nie można zastosować metody odciskowej ani użyć szablonu. W tym przypadku nie określa się liczby bakterii na X cm² lecz na całą badaną powierzchnię np. telefonu komórkowego. Do pobierania próbek używa się jałowych wymazówek wykonanych zazwyczaj z bawełny lub materiału syntetycznego. Wymazówkę wyciąga się ze sterylnej opakowania, a następnie zwilża jej koniec delikatnie zanurzając w jałowym roztworze płynu fizjologicznego lub też, gdy próbki trzeba przewieźć, w podłożu transportowym. Wymaz należy wykonywać ruchem meandrowym, obracając patyczek między palcami. Po wykonaniu wymazu patyczek umieszcza się w próbówce z jałowym płynem fizjologicznym lub w podłożu transportowym. W drugim przypadku, przed rozpoczęciem analizy, wymazówkę należy wyjąć z próbówki z podłożem transportowym i umieścić w jałowej próbówce zawierającej 10 ml płynu płuczącego. Analiza rozpoczyna się od zawieszenia drobnoustrojów w roztworze poprzez wstrząsanie wymazówki w płynie przez około 30 s. Z otrzymanego inokulum lub jego rozcieńczenia należy przenieść 1 ml płynu odpowiednio podłoże wzrostowe i inkubować w określonych warunkach. Po odpowiednim czasie oblicza się liczbę drobnoustrojów zliczając wyrosłe kolonie i przeliczając wynik na jednostkę powierzchni wymazu ze wzoru:

$$X = \frac{\bar{a} * F}{A} * D \quad (4)$$

lub ze wzoru:

$$X = \bar{a} * F * D \quad (5)$$

gdzie:

X – liczba organizmów [jkt/cm²]

$\bar{a}$ – średnia ilość jtk w 1 cm³ rozcieńczalnika

F – ilość rozcieńczalnika [cm³]

A – badana powierzchnia [cm²]

D – odwrotność stosowanego do posiewów rozcieńczenia.



Rysunek 4. Pobieranie prób metodą wymazów

Źródło: [13]

1.3. Cel badań

Celem niniejszych badań było określenie stanu zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza oraz powierzchni płaskich w pomieszczeniach Katedry Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

2. Teren i metodyka badań

2.1. Teren badań

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza oraz powierzchni użytkowych zostało zbadane w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, ul. Prowocheńskiego 1. Katedra mieści się w budynku, w którym zajęcia odbywa codziennie duża liczba studentów oraz stanowi miejsce zatrudnienia pracowników naukowych i technicznych.

Analizie poddano powietrze w laboratorium nr 1 i nr 2 oraz w toalecie damskiej. Wymienione laboratoria stanowią pomieszczenia, w których odbywają się zajęcia ze studentami, a także badania własne pracowników Katedry. W celu porównania powietrza wewnętrznego z zewnętrznym zbadano również powietrze atmosferyczne przed budynkiem Katedry Mikrobiologii Środowiskowej.

Badaniu czystości mikrobiologicznej zostały poddane powierzchnie w laboratorium nr 1: podłoga, parapety i blat stołów, a także w korytarzu przed laboratorium: blat portierni i fotele. Wymienione wyżej powierzchnie zostały wybrane ze względu na ich intensywny kontakt z dużą grupą ludzi.

2.1.1. Metodyka badań

Próbki powietrza pobrano metodą zderzeniową za pomocą impaktora MAS-100 *Eco* firmy MERCK (Rysunek 2). Objętości pobranego powietrza przyjęto na podstawie przypuszczalnego stanu zanieczyszczenia mikrobiologicznego (Tabela 2). W próbkach powietrza określano ogólną liczbę bakterii mezofilnych, ogólną liczbę grzybów

strzępkowych, liczebność gronkowców mannitolododatnich i gronkowców wykazujących hemolizę typu α oraz liczbę promieniowców. Rodzaje podłoży użytych do hodowli oraz warunki inkubacji wybrano na podstawie polskich norm ochrony czystości powietrza [9-10] (Tabela 3). Liczba mikroorganizmów została obliczona ze odpowiedniego wzoru (3).

Tabela 2. Objętość pobranego powietrza w danym punkcie poboru dla poszczególnych grup drobnoustrojów

Stanowisko Wskaźnik	Lab. nr 1	Lab. nr 2	Toaleta damska	Powietrze zewnętrzne
bakterie mezofilne	50 dm ³	150 dm ³	50 dm ³	150 dm ³
gronkowce wykazujące hemolizę α	100 dm ³	150 dm ³	100 dm ³	200 dm ³
gronkowce mannitolododatnie	150 dm ³	150 dm ³	150 dm ³	200 dm ³
promieniowce	150 dm ³	150 dm ³	150 dm ³	200 dm ³
grzyby strzępkowe	50 dm ³	100 dm ³	50 dm ³	150 dm ³

Źródło: Opracowanie własne. Lab. - laboratorium

Tabela 3. Podłoża i warunki inkubacji wg PN-89 Z-0411/02 i 03

Wskaźnik	Podłoże	Warunki inkubacji	
		temperatura	czas
bakterie mezofilne	agarowe	37°C	24-48 h
gronkowce wykazujące hemolizę α	agarowe z 5% krwi baraniej	37°C	24-48 h
gronkowce mannitolododatnie	Chapmana	37°C	24-48 h
promieniowce	Pochona	26°C	5 dni
grzyby strzępkowe	Saburouda	26°C	5-7 dni

Źródło: [9-10]

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powierzchni płaskich zostało zbadane metodą wymazów z powierzchni określonej szablonem o wymiarach 5x5 cm oraz 10x10 cm. W próbkach pobranych z wymienionych wyżej powierzchni badano ogólną liczbę bakterii i grzybów strzępkowych, liczbę bakterii z grupy coli, a także liczebność pałeczek okrężnicy (*Escherichia coli*) oraz gronkowców. Zastosowane podłoża i warunki inkubacji przedstawiono w Tabeli 4. Liczba mikroorganizmów została obliczona z odpowiedniego wzoru (4).

Tabela 4. Podłoża i warunki inkubacji do hodowli mikroorganizmów z powierzchni użytkowych

Wskaźnik:	Podłoże	Warunki inkubacji	
		temperatura	czas
ogólna liczba bakterii	agarowe	37°C	24-48 h
grupa coli	Chromocult	37°C	24-48 h
<i>Escherichia coli</i>	agar mFC	44°C	24-48 h
gronkowce	Chapmana	7°C	24-48 h
grzyby mikroskopowe	RBC z chloramfenikolem	26°C	5-7 dni

*Źródło:*Opracowanie własne.

3. Wyniki badań i dyskusja

3.1. Stan zanieczyszczenia powietrza

Przeprowadzone badanie wykazało, że w powietrzu laboratorium nr 1 występuje najmniejsza ogólna liczba bakterii, w porównaniu z innymi badanymi pomieszczeniami. Poziom czystości powietrza w tym punkcie pomiarowym był zbliżony do czystości powietrza przed Katedrą Mikrobiologii Środowiskowej, pod względem tej grupy

mikroorganizmów. Prawie trzykrotnie wyższe zanieczyszczenie występowało w laboratorium nr 2 i w toalecie damskiej, przez co zostało zakwalifikowane (zgodnie z wytycznymi polskich norm) jako średnio zanieczyszczone. Odnosząc się natomiast do wytycznych Krzysztofika [17] ogólna liczba bakterii we wszystkich pomieszczeniach mieści się w wartościach dopuszczalnych.

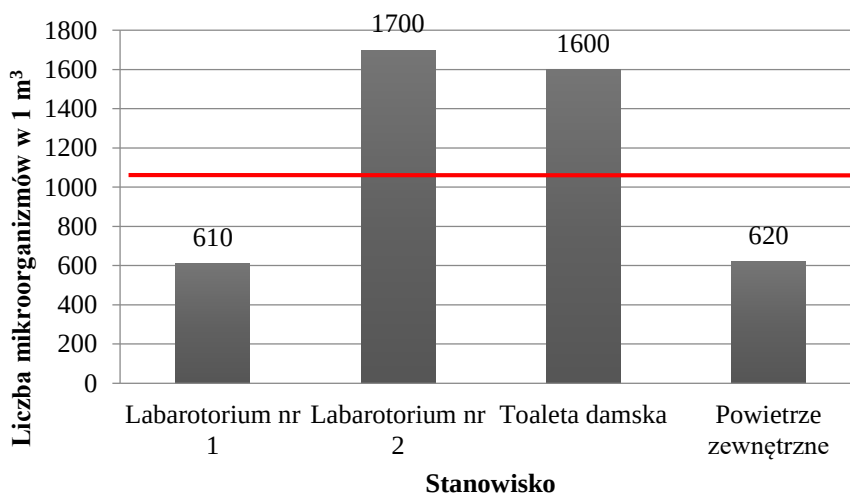
W powietrzu laboratorium nr 1 nie wykryto gronkowców wykazujących hemolizę α , natomiast z pozostałych badanych pomieszczeniach ich liczba w powietrzu nie przekraczała 25 jtk/m^3 , co świadczy o jego średnim zanieczyszczeniu. Silne zanieczyszczenie powietrza tą grupą mikroorganizmów wykazało powietrze zewnętrzne.

Pod względem występowania gronkowców mannitolododatnich, powietrze w laboratorium nr 2, w toalecie damskiej oraz zewnętrzne wykazało silne zanieczyszczenie, przy czym w pierwszym z wymienionych pomieszczeń zanieczyszczenie było prawie 7 razy wyższe od dwóch pozostałych. Powietrze w laboratorium nr 1 wykazało średni stopień zanieczyszczenia tymi drobnoustrojami.

Powietrze w badanych pomieszczeniach wykazało brak zanieczyszczenia promieniowcami. Natomiast w powietrzu przed Katedrą ich poziom przekroczył próg 10 jtk/m^3 tym samym sklasyfikowano je jako średnio zanieczyszczone.

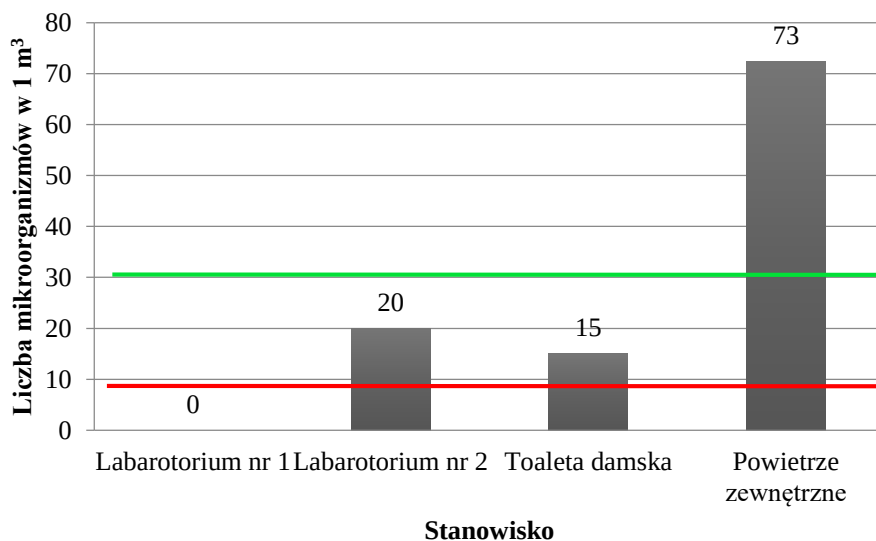
Wg polskich norm powietrze na wszystkich stanowiskach nie było znacząco zanieczyszczone grzybami strzępkowymi. Biorąc pod uwagę wytyczne Krzysztofika [17], liczba grzybów w m^2 powietrza w laboratorium nr 2 i toalecie damskiej przekroczyła dopuszczalną wartość.

Wyniki przedstawiono na wykresach (Rysunek 5-9). Czerwoną linią zaznaczono próg, powyżej którego powietrze wykazuje średnie zanieczyszczenie, natomiast powyżej linii zielonej silne zanieczyszczenie [9].



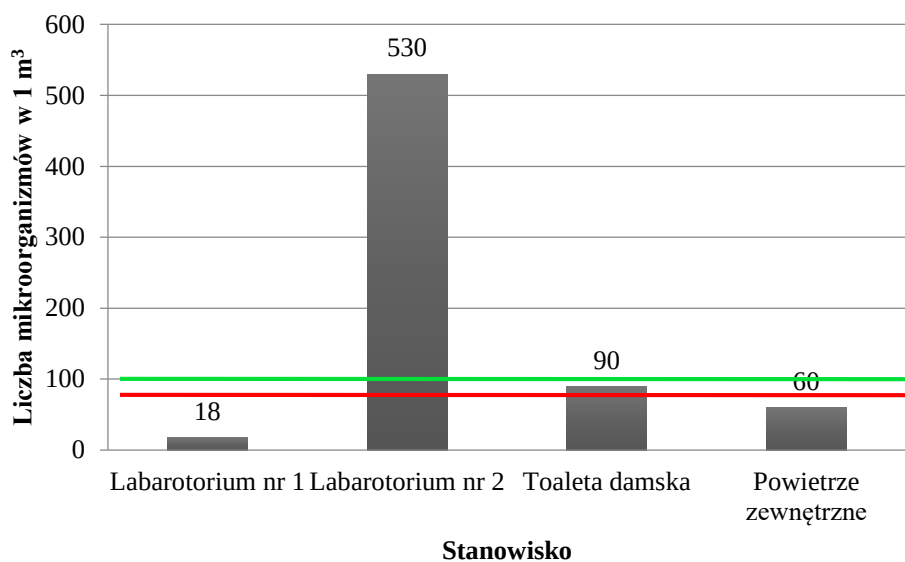
Rysunek 5. Ogólna liczba bakterii w powietrzu

Źródło: Opracowanie własne



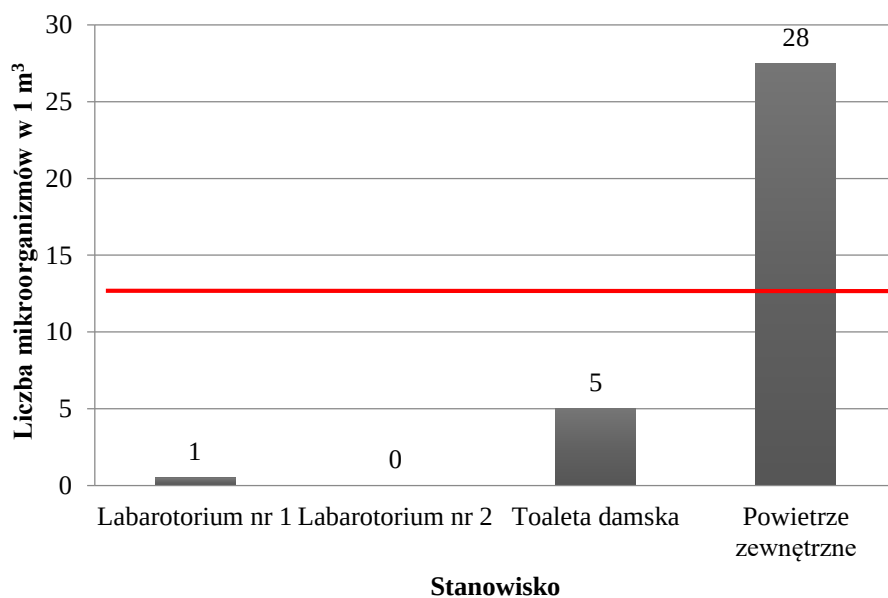
Rysunek 6. Liczba gronkowców wykazujących hemolizę α

Źródło: Opracowanie własne



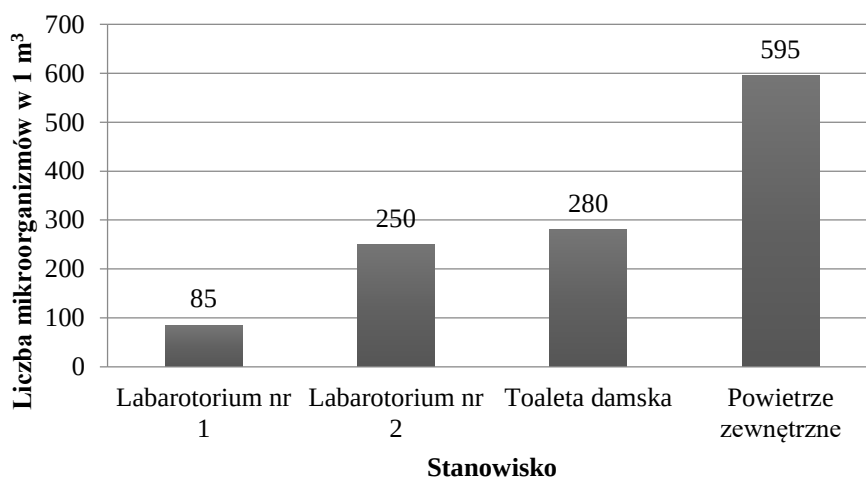
Rysunek 7. Liczba gronkowców mannitolododatnich

Źródło: Opracowanie własne



Rysunek 8. Liczba promieniowców

Źródło: Opracowanie własne



Rysunek 9. Ogólna liczba grzybów strzępkowych w powietrzu

Źródło: Opracowanie własne

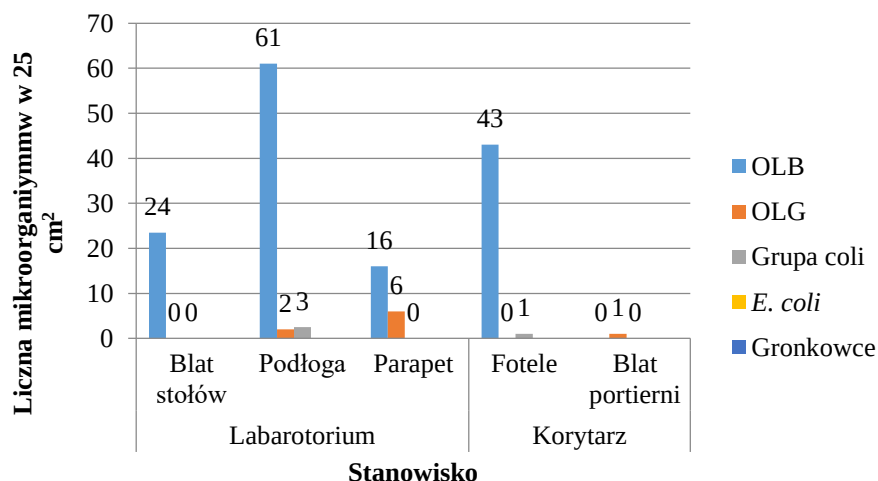
Biorąc pod uwagę wszystkie badane grupy bakterii i ich liczbę w powietrzu, wg polskich norm powietrze w laboratorium nr 1 zakwalifikowano jako średnio zanieczyszczone, natomiast powietrze w pozostałych pomieszczeniach oraz zewnętrzne jako silnie zanieczyszczone. Na żadnym ze stanowisk nie odnotowano natomiast nadmiernego zanieczyszczenia powietrza grzybami strzępkowymi.

Poziom zanieczyszczenia powietrza w dwóch miejskich przedszkolach został zbadany przez Kubera i in. [18]. Autorzy wykazali, że powietrze wewnątrz i na zewnątrz budynków różni się rodzajem drobnoustrojów stanowiących główny czynnik zanieczyszczający. Wewnątrz budynków dominują bakterie, natomiast na zewnątrz grzyby pleśniowe. Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy potwierdzają tę obserwację, pod warunkiem, że analizowana będzie tylko ogólna liczba bakterii i grzybów strzępkowych. Wysoki poziom zanieczyszczenia gronkowcami powietrza zewnętrznego może wynikać z bliskości pojemników czasowego składowania odpadów komunalnych.

Kubera i in. [18] nie odnotowali także zanieczyszczenia powietrza grzybami pleśniowymi w budynkach.

3.2. Stan zanieczyszczenia powierzchni

Powierzchnie użytkowe w laboratorium nr 1 oraz na korytarzu przed nim nie wykazały silnego zanieczyszczenia. Najbardziej zanieczyszczoną powierzchnią była podłoga w laboratorium nr 1 (Rysunek 10). Na żadnym ze stanowisk nie wykryto bakterii z gatunku *Escherichia coli* oraz gronkowców. Liczba bakterii z grupy coli było znikoma. W Polsce normy czystości powierzchni obowiązują tylko w szpitalach, zakładach farmaceutycznych oraz przemyśle spożywczym. Odnosząc jednak uzyskane wyniki badania stanu czystości mikrobiologicznej powierzchni użytkowych do normy PN-A-82055-19:2000 [19], stosowanej z zakładach przemysłu mięsnego można ocenić wszystkie badane powierzchnie na poziom celujący.



Rysunek 10. Zanieczyszczenie powierzchni

Źródło: Opracowanie własne; OLB – ogólna liczba bakterii; OLG – ogólna liczba grzybów strzępkowych, *E. coli* – *Escherichia coli*

4. Wnioski

1. Stopień zanieczyszczenie powietrza bakteriami w pomieszczeniach Katedry Mikrobiologii Środowiskowej był znaczny.
2. Nie stwierdzono zanieczyszczenia mikroorganizmami badanych powierzchni użytkowych.
3. Ogólny stan zanieczyszczenia środowiska w badanym budynku oceniono na poziom średni. W celu poprawienia jakości mikrobiologicznej środowiska konieczny jest systematyczny monitoring i zabiegi zapobiegające biologicznemu zanieczyszczeniu, np. naświetlanie promieniami UV w laboratoriach.

Literatura:

1. Gładysz J., Grzesiak A., Nieradko-Iwanicka B., Borzęcki A.: *Wpływ zanieczyszczenia powietrza na stan zdrowia i spodziewaną długość życia ludzi*. Probl. Hig.Epidemiol., 91(2), 2010, str. 178–180.
2. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawełczyk A.: *Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2005, str. 90-102.
3. Zmysłowska I.: *Mikrobiologia ogólna i środowiskowa. Teoria i ćwiczenia*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, 2009.
4. Karwowska E.: *Microbiological air contamination in some education settings*. Pol. J. Environ. Stud. 12(2), 2003, str. 181–185.
5. Jung J.H., Lee J.E., Kim S.S.: *Thermal effects on bacterial bioaerosols in continuous air flow*. Sci. Total Environ. 407(16), 2009, str. 4723–4730.

6. Hospodsky D., Qian J., Nazaroff W.W., Yamamoto N., Bibby K., Rismani-Yazdi H., Peccia J.: *Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria*. PLoS One, 7(4), 2012, str. 34867.
7. Butarewicz A.: *Mikrobiologiczna jakość powietrza w budynku Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Białostockiej*. Roczn. Państw. Zakł. Hig. 56(2), 2005, str. 199–206.
8. Gołofit-Szymczak M., Ławniczek-Wałczyn A., Górny R.L.: *Ilościowa i jakościowa kontrola szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy*. Podst. Met. Oceny Środ. Pr. 2(76), 2013, str. 5–17.
9. PN-Z-04111-02. *Ochrona czystości powietrza – Badania mikrobiologiczne – Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1989.
10. PN-Z-04111-03. *Ochrona czystości powietrza – Badania mikrobiologiczne – Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1989.
11. Zmysłowska I. (Red.): *Mikrobiologia ogólna i środowiskowa*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, 2002.
12. Kaźmierczuk M., Kalisz L., Sałbut J.: *Mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza w otoczeniu obiektów gospodarki komunalnej*. Dział Wydawnictw IOŚ, Warszawa, 2004.
13. <https://www.ciop.pl/CIOPPortalWAR/appmanager/ciop/>, [dostęp: 12.02.2016].

14. Szymańska A.: *Monitoring higieny*. 2013.
<http://mistrzbranzy.pl/artykuly/>, [dostęp: 12.02.2016].
15. <http://www.imazo.pl/>, [dostęp: 10.02.2016].
16. <http://www.merckmillipore.com/PL/pl/>, [dostęp: 10.02.2016].
17. Krzysztofik B.: *Mikrobiologia powietrza*. Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1992.
18. Kubera Ł., Studzińska J., Dokładna W., Małecka-Adamowicz M., Donderski W.: *Mikrobiologiczna jakość powietrza w wybranych przedszkolach oraz antybiotykooporność bakterii z rodzaju Staphylococcuspp*. Medycyna Pracy, 66(1), Łódź, 2015, str. 49–56.
19. PN-A-82055-19:2000. *Mięso i przetwory mięsne - Badania mikrobiologiczne- Oznaczanie zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni urządzeń, sprzętów, pomieszczeń oraz opakowań i rąk pracowników*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa, 2000.

Jakub Knurek¹⁾

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii
i Biotechnologii, Zakład Biochemii
ul. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031, Lublin

¹⁾knurekjakub@op.pl

Odpowiedź immunologiczna jako reakcja na bakterie *Legionella* sp. bytujące w instalacjach wody ciepłej

*Immune response to infection with Legionella sp. found
in thermal water system*

Słowa kluczowe: *Legionellapneumophila*, legionelloza, system sekrecji typu IV, makrofagi płucne

Keywords: *Legionella pneumophila*, legionellosis, type IV secretion system, alveolar macrophages

Streszczenie: *Legionellapneumophila* jest bakterią należącą do Gram-ujemnych, obligatoryjnych wewnątrzkomórkowych pasożytów pierwotniaków. Atakuje ona także makrofagi płucne człowieka, powodując legionellozy – choroby o przebiegu podobnym do zapalenia płuc. Badania wykazały, że w ponad 80% przypadków zachorowań czynnikiem patologicznym okazały się szczepy serogrupy I. Do głównych czynników chorobotwórczych bakterii z rodziny *Legionellaceae* możemy zaliczyć białka błony zewnętrznej, enzymy produkowane w komórce bakterii, toksyny, pile krótkie i długie. Biorą one udział w procesach adhezyjnych, umożliwiając namnażanie bakterii w parazytosomach oraz upośledzają mechanizmy obronne komórki gospodarza. Choroby wywołane przez *L. pneumophila* określamy nazwą legionelloz. Mogą one przybierać różne formy; od grypopodobnej gorączki Pontiak do ciężkiego zapalenia płuc związanego z niewydolnością wielonarządową. Przebieg choroby i poziom śmiertelności zależą od czasu ekspozycji na czynnik zakaźny, dawki infekcyjnej, a przede wszystkim od ogólnego stanu systemu immunologicznego człowieka. System sekrecji typu IV (T4SS) umożliwia bakterii wprowadzenie do cytoplazmy komórki gospodarza białek efektorowych, które kontrolują niektóre szlaki metaboliczne. Umożliwia to przeżycie i rozmnożenie bakterii. Skuteczne leczenie legionellozy wymaga szybkiej interwencji

medyczne, u podstawy której powinno znajdować się prawidłowe rozpoznanie. Obecnie w diagnostyce złotym standardem jest hodowla mikrobiologiczna.

1. Wstęp

Do rodzaju *Legionella* zaliczamy ponad 50 gatunków bakterii [1], jednak największą zjadliwość wykazują szczepy *Legionellapneumophila*. Są to bakterie powszechnie występująca w otoczeniu człowieka. W naturalnym środowisku znajdują się one w zbiornikach słodkowodnych, rzekach, mule, wilgotnej glebie. Głównym miejscem ich pasożytowania są pierwotniaki oraz makrofagi płucne człowieka. Do zakażenia dochodzi w wyniku inhalacji aerozolu zawierającego bakterie. *L. pneumophila* wywołuje legionellozy, które mogą przebiegać w postaci trzech zespołów chorobowych (choroby legionistów, gorączki Pontiak, infekcji pozapłucnej). Do tego gatunku zaliczamy kilkanaście serotypów wyróżnionych badaniami typowania na podstawie sekwencji (SBT) oraz przeciwciał monoklonalnych (MAb) [2]. W przypadku tworzenia kolonii bakteryjnych w instalacjach wodnych wykazano dużą różnorodność gatunków należących do rodziny *Legionellaceae*, jednak większość (60-80% przypadków [3]) zachorowań na legionellozę przypisuje się serotypowi 1 *Legionellapneumophila*. Sztucznym rezerwuarem mogą być m.in. systemy klimatyzacyjne, instalacje wody ciepłej, bojler, aparaty medyczne, fontanny, myjnie, baseny, czy wieże chłodnicze [4].

Pęcherzyki płucne stanowią najmniejszą podjednostkę układu oddechowego, gdyż poprzez ich struktury zachodzi wymiana gazowa. Zbudowane są one z nabłonku jednowarstwowego płaskiego i okryte przez naczynia włosowate, przenoszące dwutlenek węgla z tkanek oraz pobierające na zasadzie dyfuzji tlen. Oprócz pneumocytów do komórek

występujących w pęcherzykach płucnych zaliczamy komórki wytwarzające surfaktant (zabezpieczający przed zapadnięciem się płuc) oraz makrofagi płucne. Makrofagi te są pierwszą linią obrony organizmu przed drobnoustrojami atakującymi dolne drogi oddechowe. Powstają one z hematopoetycznej linii komórek macierzystych szpiku kostnego, a dokładniej w wyniku różnicowania monocytów krwi. Wykazują zdolność do fagocytozy oraz działanie cytotoksyczne [5]. W czasie ataku zjadliwych drobnoustrojów mogą wydzielać do układu cytokiny (IL-1, IL-6, TNF- α), chemokiny (IL-8) oraz metabolity kwasu arachidonowego (mediatory prozapalne) [6]. Makrofagi inicjują i organizują lokalną odpowiedź na uszkodzenie tkanek, a także, jako komórki prezentujące antygen, wspomagają swoistą odpowiedź systemową. Receptory TLRs (Toll-likereceptors) związane z błoną fagocyту rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP). Częsteczki te są istotne dla przeżycia, rozmnażania, wniknięcia do komórki gospodarza patogenów (np. lipopolisacharyd *L. Pneumophila* [7]). Po przyłączeniu ligandu do receptora następuje aktywacja kinaz oraz wzmocnienie sygnału poprzez regulację ekspresji genów czynników zapalnych. Wpływa to na działanie neutrofili oraz makrofagów jako ochrony nieswoistej, a także prezentowanie antygenów limfocytom odpowiedzialnym za mechanizm obrony swoistej. Wytwarzane czynniki ułatwiają fagocytozę drobnoustroju przez makrofagi płucne oraz jego degradację na drodze różnych mechanizmów odpornościowych [8].

1.1. Strategia obronna *L. pneumophila*

Pochłonięte na drodze spiralnej fagocytozy bakterie *L. pneumophila* znajdują się w parazytosomach i tworzą strukturę LCV (ang. *Legionella containing vacuole*). Czynniki VipD (ang. vacuolar

protein sorting inhibitor protein D) wykazuje aktywność fosfolipazy A1, co pozwala na przeprowadzenie translokacji białek do komórki gospodarza za pomocą systemu sekrecji typu IV (T4SS) [9, 10]. Blokuje to przez 8-12 godzin fuzję wakuoli z lizosomami. Zahamowanie kumulacji enzymów trawiennych skutkuje zahamowaniem przekształcania parazytosomu w wakuolę trawienną. Czasowa blokada procesu dojrzewania fagosomu prowadzi do dalszych zmian w komórce gospodarza, polegających na opłaszczeniu parazytosomu przez błony retikulum endoplazmatycznego i zagęszczeniu mitochondriów wokół LCV [11]. Nisza replikacyjna powstaje w wyniku ciągłego przepływu białek przez T4SS.

Proces replikacji przebiega w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą żywiciela. Przechodząc ze stanu anabiozy w fazę replikacyjną, bakterie tracą swą aktywność cytotoksyczną, urzęsienie, a także szereg innych cech charakterystycznych dla postaci infekcyjnych, niezbędnych do przeżycia w środowisku wodnym. W tej fazie zablokowane są nie tylko procesy związane z syntezą rzęsek czy białek odpowiedzialnych za dojrzewanie niszy replikacyjnej, ale również synteza β -hydroksymaślanu (źródło energii) [12]. Zwiększa się natomiast wrażliwość drobnoustroju na niskie pH.

Intensywny wzrost ilości pałeczek w parazytosomie prowadzi do wyczerpania substancji odżywczych komórki gospodarza, co powoduje przejście w fazę inwazyjną. Dojrzałe postaci infekcyjne przyjmują kształt krótkich, grubych pałeczek o zaokrąglonych biegunach, zawierających wewnątrz ziarna polimeru kwasu β -hydroksymaślowego. Takie formy są odporne na stres oksydacyjny i osmotyczny (rola białka Mag-A [13]), zmiany wartości pH oraz wysoką temperaturę. W komórkach bakterii wzrasta zawartość białek niezbędnych w procesie

adhezji i wnikania do wnętrza komórek – DotO, DotH, FlaA, Mip, Hsp60, MOMP, [14, 15]. Proces ten poprzedza wydostanie się bakterii z wyeksploatowanej komórki, a następnie nową rundę replikacyjną po wniknięciu do kolejnego gospodarza i przełamaniu jego bariery immunologicznej.

2. Najważniejsze funkcje białek IV systemu sekrecyjnego

Do grupy białek błony zewnętrznej możemy zaliczyć klasę białek szoku cieplnego (ang. Heatshockproteins), które hamują apoptozę mitochondrialną [16], białko MOMP, które funkcjonuje w czasie adhezji oraz stymuluje spiralną fagocytozę [17], białko Mip, które pozwala pałeczkom *Legionella* przetrwać wewnątrz komórek gospodarza, wykazując właściwości ochronne wobec egzoprotein gospodarza. Białko po wydzieleniu do światła komórki za pośrednictwem systemu sekrecyjnego typu II ulega pofałdowaniu i dojrzewa, przechodząc z formy enzymatycznie nieaktywnej do aktywnej [18].

Białka przenoszone z pomocą T4SS są szczególnie zaangażowane w inwazję makrofagów i przejęcie kontroli nad ich metabolizmem. Rodzina białek SidE wymagana jest do stworzenia środowiska sprzyjającego wzrostowi *L. pneumophila* wewnątrz LCV. Ich działanie kontroluje inny czynnik SidJ, kodowany przez ten sam gen co SidE [19, 20]. Białko LidA odpowiada za indukcję replikacji oraz gromadzenie pęcherzyków ER wokół parazytosomu [21, 22]. Geny kodujące białka T4SS umieszczone są w dwóch regionach genoformy i zorganizowane są w dziewięciu jednostkach transkrypcyjnych [23]. Białka powstałe w wyniku ich ekspresji pełnią podstawowe role w procesach przebudowy membrany fagosomów, kontroli aparatu transportowego oraz tworzenia kanałów w plazmolemmie po namnożeniu drobnoustroju w komórce

gospodarza. Wykazano również istotną aktywność antyapoptotyczną, pozwalającą na optymalizację rozwoju *L. pneumophila* i lizę makrofaga dopiero po namnożeniu bakterii [24].

Tabela 1. Przegląd białek IV systemu sekrecyjnego *Legionellapneumophila*

Nazwa białka	Funkcja białka	Lokalizacja białka	Źródło
IcmX	Tworzenie niszy replikacyjnej	Periplazma	25
IcmW	Rekrutacja pęcherzyków ER Tworzenie porów w błonie makrofagów Białko chaperonowe dla innych białek T4SS Współpraca z IcmS	Cytoplazma	26 27
IcmV	Nieznana funkcja	Membrana wewnętrzna	-
DotA	Zapobieganie fuzji fagosomów z lizosomami Zapobieganie opłaszczaniu LCV przez LAMP1, LAMP2, Rab7	Membrana wewnętrzna	27 28
DotB	Aktywność ATPazowa	Cytoplazma	29
DotC	Motyw lipobox Stabilizacja błon LCV	Lipoproteina/ Periplazma	30

DotD	Motyw lipobox Stabilizacja błon LCV	Lipoproteina/ Periplazma	30
IcmT	Tworzenie porów w błonie fagosomu	Membrana wewnętrzna	31
IcmS	Rekrutacja pęcherzyków ER Tworzenie porów w błonie makrofagów Białko chaperonowe dla innych białek T4SS Współpraca z rodziną białek SidE Współpraca z IcmW	Cytoplazma	26 27 32
IcmR	Stabilizacja struktury IcmQ	Cytoplazma	33 34
IcmQ	Formowanie porów translokacyjnych	Cytoplazma	33 34
IcmP	Wiązanie i translokacja ATPazy Współpraca z IcmO i IcmJ	Membrana wewnętrzna	35 36
IcmO	Wiązanie i translokacja ATPazy Współpraca z IcmP i IcmJ	Membrana wewnętrzna	35 36
IcmN	Motyw lipobox Stabilizacja błon LCV	Lipoproteina/ Periplazma	30

IcmM	Wzrost wewnątrzkomórkowy Współpraca z IcmL	Membrana wewnętrzna	37 38
IcmL	Współpraca z IcmM Nieznana funkcja	Membrana wewnętrzna	38
IcmK	Adhezja do powierzchni makrofagów Ucieczka z LCV Współpraca z IcmE i IcmG	Periplazma	39 40 41
IcmE	Ucieczka z LCV Współpraca z IcmK i IcmG	Membrana wewnętrzna	40 41
IcmG	Ucieczka z LCV Współpraca z IcmK i IcmE	Membrana wewnętrzna	40 41
IcmC	Współpraca z IcmD Nieznana funkcja	Membrana wewnętrzna	41
IcmD	Współpraca z IcmC Nieznana funkcja	Membrana wewnętrzna	41

IcmJ	Wiązanie i translokacja ATPazy Współpraca z IcmO i IcmP	Cytoplazma	35 36
IcmB	Adhezja do powierzchni makrofagów	Cytoplazma	39
IcmF	Stabilizacja struktur T4SS Regulacja cytotoksyczności Regulacja wrażliwości na sód	Membrana wewnętrzna	42 43
IcmH	Regulacja cytotoksyczności Regulacja wrażliwości na sód	Membrana wewnętrzna	43

Zródło: Opracowanie własne. Lokalizacje białek na podstawie [23]

3. Dyskusja

Legionellapneumophila jest groźną bakterią. Największymwybuchemlegionellozyw XXI wieku było ognisko powstałe w szpitalu w okolicy Murcji na przełomie czerwca i lipca 2001 roku. Podejrzewano, że zarażonych zostało ponad 800 osób, a kilka tysięcy miało kontakt z bakteriami *Legionella*. Dzięki szybkiemu wykryciu choroby i zastosowaniu właściwej strategii leczniczej, śmiertelność wyniosła zaledwie 0,8% (6 osób). Epidemia praktycznie sparaliżowała hiszpańskie miasto na miesiąc [44]. Do ostatnich potwierdzonych przypadków wybuchu legionellozy doszło w listopadzie 2014 roku na terenie Portugalii, w Lizbonie. Na przedmieściach Vila Franca

de Xirahospitalizowanych zostało ponad 300 osób. Zgłoszonych zostało również jedenaście zgonów. Prawdopodobnym powodem zakażenia był brak przestrzegania norm działania wież chłodniczych przez zakład produkujący nawozy Fertibéria [45]. Przykłady te pokazują, że nawet w obecnych czasach musimy zachować szczególną ostrożność.

Analizując przypadki legionelloz należy skupić się na profilaktyce. Szczególnie istotna jest ona w przypadku instalacji wody ciepłej, gdyż w wyniku jednostkowych niedopatrzeń może rozpocząć się zakażenie bakteryjne. Uwagę należy zwrócić na biofilny bakteryjne, które mogą się tworzyć w systemach kanalizacyjnych lub rurach odpływowych. *Legionellapneumophila* prawie nigdy nie występuje jako monokultura. Do optymalnego rozwoju poza organizmem człowieka potrzebuje innych drobnoustrojów, tworzących odpowiednie środowisko oraz będących rezerwuarem dla bakterii. Przykładem takiego organizmu może być *Acanthamoebacastellanii*, przedstawiciel gromady *Discosea*. Ameby odgrywają kluczową rolę we wzroście i rozprzestrzenianiu *L.pneumophila* w antropogenicznych systemach wodnych, a tym samym przyczyniają się do wystąpienia choroby legionistów [46].

W kontekście szerokiego asortymentu obronnego naszego organizmu bakterie należące do rodzaju *Legionella* radzą sobie zaskakująco dobrze. Wykazano umiejętność inhibicji syntezy interferonu gamma (IFN- γ) po powstaniu LCV [47]. Bakterie posiadły na drodze ewolucji mechanizm pozwalający na ucieczkę przed odpowiedzią immunologiczną organizmu. T4SS pozwala na wyciszenie odpowiedzi na poziomie makrofaga dzięki translokacji białek regulatorowych. Sprawia to, że antygeny nie są prezentowane, a sama reakcja odpornościowa zachodzi ze znacznym opóźnieniem. W zależności od gatunku zachodzą niewielkie modyfikacje w chromosomie bakteryjnym, które niosą za sobą

duże zmiany w funkcjonalności białek T4SS, a co za tym idzie infekcyjności drobnoustrojów [48].

Charakterystyka systemu sekrecji typu IV u bakterii *Legionellapneumophila* nadal nie jest kompletna. Przedstawione w powyższym artykule dane odzwierciedlają obecną wiedzę na temat struktur oraz funkcji przez nie pełnionych. Aby dokładniej poznać i zrozumieć działanie mechanizmów obronnych bakterii potrzeba jeszcze wielu badań.

4. Wnioski

1. System sekrecji typu IV (T4SS) umożliwia bakteriom *L. pneumophila* translokację białek, przeżycie wewnątrz makrofaga oraz inhibicję kontroli immunologicznej.
2. Białka T4SS tworzą funkcjonalne kompleksy działające synergistycznie (współpraca IcmW i IcmS, IcmM i IcmL czy IcmK, IcmE oraz IcmG). Umożliwia to kumulację białek pełniących określoną rolę i wzmocnienie specyficznego działania komórkowego.
3. Białka T4SS zlokalizowane są w różnych strukturach komórkowych. Zwiększa to zakres działania i pozwala na przejęcie kontroli nad szlakami metabolicznymi komórki gospodarza.
4. Makrofagi płucne, które wchłonęły LCV nie prezentują antygenów bakteryjnych, nie wydzielają do układu substancji prozapalnych i nie mogą przeprowadzić lizy bakterii, gdyż LCV nie jest opłaszczone przez czynniki LAMP1 i LAMP2.
5. *Legionellapneumophila* jest jedną z bakterii tworzących biofilm bakteryjny. Posiada możliwość rozmnażania się w pierwotniakach, z którymi następnie transportowana jest m.in. poprzez instalacje wody

cieplej. Ograniczenie ilości pierwotniaków znacząco zmniejszy ilość bakterii, a co za tym idzie prawdopodobieństwo zakażenia.

Literatura:

1. <http://www.bacterio.net/index.html> [dostęp: 29.02.2016r.]
2. Borchardt J., Helbig J. H., Lück P. C.: *Occurrence and distribution of sequence types among Legionella pneumophila strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, nr 27, 2008, str. 29-36.
3. Rokosz N., Rastawicki W., Zasada A. A., Baczewska-Rej M.: *Microbiological diagnosis of respiratory infections caused by Legionella pneumophila*, Pneumonologia i Alergologia Polska, nr 78, 2010, str. 54–59.
4. Kalicki B., Placzyńska M., Milart J., Żylak A., Rusteka A., Jung A.: *Zakażenia pałeczkami Legionella pneumophila – opis przypadku*, nr 7, 2011, Pediatria i Medycyna Rodzinna, str. 415-419.
5. Rubins J. B.: *Alveolar Macrophages*, nr 167, 2003, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, str. 103-104.
6. Haslett C.: *Granulocyte Apoptosis and Its Role in the Resolution and Control of Lung Inflammation*, [w:] *Supplement: Inflammation in Chronic Obstructive Lung Disease*, nr 160, 1999, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 160, str. 5-11
7. Reichardt K., Jacobs E., Roske I., Helbig J. H.: *Legionella pneumophila carrying the virulence-associated lipopolysaccharide epitope possesses two functionally different LPS components*, nr 156, 2010, Microbiology, str. 2953-2961.

8. Moldoveanu B., Otmishi P., Jani P., Walker J., Sarmiento X., Guardiola J., Saad M., Yu J.: *Inflammatory mechanisms in the lung*, nr 2, 2009, Journal of Inflammation Research, str. 1-11.
9. Lucas M., Gaspar A. H., Pallara C., Rojas A. L., Fernandez-Recio J., Machner M. P., Hierro A.: *Structural basis for the recruitment and activation of the Legionella phospholipase VipD by the host GTPase Rab5*, nr 111, 2014, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, str. 3514-3523.
10. Horwitz M. A.: *The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes*, nr 158, 1983, Journal of Experimental Medicine, str. 2108-2126.
11. Jäger J., Keese S., Roessle M., Steinert M., Schromm A. B.: *Fusion of Legionella pneumophila outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes*, nr 17, 2015, Cellular Microbiology, DOI: 10.1111/cmi.12392
12. Gillmaier N., Schunder E., Kutzner E., Tlapak H., Rydzewski K., Herrmann V., Stammeler M., Lasch P., Eisenreich W., Heuner K.: *Growth-Related Metabolism of the Carbon Storage Poly-3-Hydroxybutyrate in Legionella pneumophila*, 2016, Journal of Biological Chemistry, DOI: 10.1074/jbc.M115.693481.
13. Hiltz M. F., Sisson G. R., Brassinga A. K., Garduno E., Garduno R. A., Hoffman P. S.: *Expression of magA in Legionella pneumophila Philadelphia-1 is developmentally regulated and marker of formation of mature intracellular forms*, nr 186, 2004, Journal of Bacteriology, str. 3038-3045.

14. Segal G., Russo J. J., Shuman H. A.: *Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of Legionella pneumophila*, nr 34, 1999, Molecular Microbiology, str. 799-809.
15. Xu L., Luo Z. Q.: *Cell biology of infection by Legionella pneumophila*, nr 15, Microbes and Infection, 2013, str. 157-167.
16. Retzlaff C., Yamamoto Y., Okubo S., Hoffman P. S., Friedman H., Klein T. W.: *Legionella pneumophila heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 α mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages*, nr 89, Immunology, 1996, str. 281-288.
17. Bellinger-Kawahara C., Horwitz M. A., *Complement C3 Fixes Selectively to Major Outer Membrane Protein (MOMP) of Legionella pneumophila and Mediates Phagocytosis of Liposome-MOMP Complexes by Human Monocytes*, nr 172, Journal of Experimental Medicine, 1990, str. 1201-1210.
18. Kohler R., Fanghanel J., König B., Luneberg E., Frosch M., Rahfeld J. U., Hilgenfeld R., Hacker J., Steinert M.: *Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of Legionella pneumophila*, nr 71, Infection and Immunity, 2003, str. 4389-4397.
19. Havey J. C., Roy C. R.: *Toxicity and SidJ-Mediated Suppression of Toxicity Require Distinct Regions in the SidE Family of Legionella pneumophila Effectors*, nr 83, Infection and Immunity, 2015, str. 3506-3514.
20. Jeong K. C., Sexton J. A., Vogel J. P.: *Spatiotemporal Regulation of a Legionella pneumophila T4SS Substrate by the Metaeffector SidJ*, nr 11, PLoS Pathogens, 2015, DOI: 10.1371/journal.ppat.1004695.

21. Conover G. M., Derre I., Vogel J. P., Isberg R. R.: *The Legionella pneumophilaLidA protein: a translocated substrate of the Dot-Icm system associated with maintenance of bacterial integrity*, nr 48, Molecular Microbiology, 2003, str. 305-321.
22. Derre I., Isberg R. R.: *LidA, a Translocated Substrate of the Legionella pneumophila Type IV Secretion System, Interferes with the Early Secretory Pathway*, nr 73, Infection and Immunity, 2005, str. 4370-4380.
23. Segal G., Feldman M., Zusman T.: *The Icm/Dot type-IV secretion systems of Legionella pneumophila and Coxiellaburnetii*, nr 29, FEMS Microbiology Reviews, 2005, str. 65-81.
24. Molmeret M., Bitar D. M., Han L., Abu Kwaik Y.: *Cell biology of intracellular infection by Legionella pneumophila*, nr 6, Microbes and Infection, 2004, str. 129-139.
25. Matthews M., Roy C. R.: *Identification and subcellular localization of the Legionella pneumophilaIcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells*, nr 68, Infection and Immunity, 2000, str. 3971-3982.
26. Ninio S., Zuckman-Cholon D. M., Cambronne E. D., Roy C. R.: *The Legionella IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation*, nr 55, Molecular Microbiology, 2005, str. 912-926.
27. Nagai H., Roy C. R.: *TheDotA protein from Legionella pneumophila is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter*, nr 20, The EMBO Journal, 2001, str. 5962-5970.
28. Pan X., Luhrmann A., Satoh A., Laskowski-Arce M. A., Roy C. R.: *Ankyrin Repeat Proteins Comprise a Diverse Family of Bacterial Type IV Effectors*, nr 320, Science, 2008, str. 1651-1654.

29. Sexton J. A., Yeo H. J., Vogel J. P.: *Genetic analysis of the Legionella pneumophila DotB ATPase reveals a role in type IV secretion system protein export*, nr 57, Molecular Microbiology, 2005, str. 70-84.
30. Yerushalmi G., Zusman T., Segal G.: *Additive Effect on Intracellular Growth by Legionella pneumophila Icm/Dot Proteins Containing a Lipobox Motif*, nr 73, Infection and Immunity, 2005, str. 7578-7587.
31. Molmeret M., O. A. TerryAlli, Zink S., Flieger A., Cianciotto N. P., Abu Kwaik Y.: *icmT Is Essential for Pore Formation-Mediated Egress of Legionella pneumophila from Mammalian and Protozoan Cells*, nr 70, Infection and Immunity, 2002, str. 69-78.
32. Bardill J. P., Miller J. L., Vogel J. P.: *IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the Legionella pneumophila type IV secretion system*, nr 56, Molecular Microbiology, 2005, str. 90-103.
33. Raychaudhury S., Farelli J. D., Montminy T. P., Matthews M., Menetret J. F., Dumenil G., Roy C. R., Head J. F., Isberg R. R., Akey C. W.: *Structure and function of interacting IcmR-IcmQ domains from a Type IVb secretion system Legionella pneumophila*, nr 17, Structure, 2009, str. 590-601.
34. Dumenil G., Isberg R. R.: *The Legionella pneumophila IcmR protein exhibits chaperone activity for IcmQ by preventing its participation in high-molecular-weight complexes*, nr 40, Molecular Microbiology, 2001, str. 1113-1127.
35. Isberg R. R., O'Connor T., Heidtman M.: *The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cozy niche inside host cells*, nr 7, Nature Reviews Microbiology, 2009, str. 13-24.
36. Busher B. A., Conover G. M., Miller J. L., Vogel S. A., Meyers S. N., Isberg R. R., Vogel J. P.: *The DotL Protein, a Member of the TraG-Coupling Protein Family, Is Essential for Viability of Legionella*

- pneumophila Strain Lp02*, nr 187, Journal of Bacteriology, 2005, str. 2927-2938.
37. Gal-Mor O., Zusman T., Segal G.: *Analysis of DNA Regulatory Elements Required for Expression of the Legionella pneumophila icm and dot Virulence Genes*, nr 184, Journal of Bacteriology, 2002, str. 3823-3833.
 38. Kuroda T., Kubori T., Bui X. T., Hyakutake A., Uchida Y., Imada K., Nagai H.: *Molecular and structural analysis of Legionella DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion*, nr 5, Scientific Reports, 2015, DOI: doi:10.1038/srep10912
 39. Watarai M., Andrews H. L., Isberg R. R.: *Formation of a fibrous structure on the surface of Legionella pneumophila associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth*, nr 39, Molecular Microbiology, 2001, str. 313-329.
 40. Vincent C. D., Vogel J. P.: *The Legionella pneumophila IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth*, nr 61, Molecular Microbiology, 2006, str. 596-613.
 41. Nagai H., Kubori T.: *Type IVB Secretion Systems of Legionella and Other Gram-Negative Bacteria*, nr 2, Frontiers in Microbiology, 2011, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00136
 42. Sexton J. A., Miller J. L., Yoneda A., Kehl-Fie T. E., Vogel J. P.: *Legionella pneumophila DotU and IcmF Are Required for Stability of the Dot/Icm Complex*, nr 72, Infection and Immunity, 2004, str. 5983-5992.
 43. Zusman T., Feldman M., Halperin E., Segal G.: *Characterization of the icmH and icmF Genes Required for Legionella pneumophila Intracellular Growth, Genes That Are Present in Many Bacteria*

- Associated with Eukaryotic Cells*, nr 72, Infection and Immunity, 2004, str. 3398-3409.
44. Garcia-Fulgueiras A., Navarro C., Fenoll D., Garcia J., Gonzalez-Diego P., Jimenez-Bunuales T., Rodriguez M., Lopez R., Pacheco F., Ruiz J., Segovia M., Baladron B., Pelaz C.: *Legionnaires' Disease Outbreak in Murcia, Spain*, nr 9, Emerging Infectious Diseases, 2003, str. 915-921.
 45. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20991> [dostęp: 29.02.2016r.]
 46. Declerck P., Behets J., Margineanu A., van Hoef V., De Keersmaecker B., Ollevier F.: *Replication of Legionella pneumophila in biofilms on water distribution pipes*, nr 164, Microbiological research, 2009, str. 593-603.
 47. Santic M., Molmeret M., Abu Kwaik Y.: *Maturation of the Legionella pneumophila-Containing Phagosome into a Phagolysosome within Gamma Interferon-Activated Macrophages*, nr 73, Infection and Immunity, 2005, str. 3166-3171.
 48. Burstein D., Amaro F., Zusman T., Lifshitz Z., Cohen O., Gilbert J. A., Pupko T., Shuman H. A., Segal G.: *Genomic analysis of 38 Legionella species identifies and diverse effector repertoires*, nr 48, Nature Genetics, 2016, DOI: 10.1038/ng.3481

Joanna Irena Olejniczak¹⁾, dr inż. Irena Kaszkowiak
Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii
ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok
¹⁾olej12Irenna@gmail.com

Ocena mikrobiologicznej czystości powietrza na terenie Schroniska dla zwierząt w Białymstoku

*Evaluation of microbiological air quality of Białystok's
animal shelter*

Słowa kluczowe: *aerozole biologiczne, mikrobiologia powietrza, stan sanitarny powietrza*

Keywords: *biological aerosols, air microbiology, sanitary condition of the air*

Streszczenie: W niniejszej pracy przedstawiono ocenę mikrobiologicznej czystości powietrza na terenie Schroniska dla zwierząt w Białymstoku. Przeprowadzono badania w danym obiekcie, aby dokonać analizy powietrza pod względem obecności drobnoustrojów mogących negatywnie wpływać na stan zdrowia zwierząt tam przebywających, również pracujących ludzi. Badania wykonywano przez pięć miesięcy od maja do października w czterech wyznaczonych punktach pomiarowych stosując metodę zderzeniową przy pomocy mikrobiologicznego próbnika powietrza. W każdym punkcie oznaczono ogólną liczbę bakterii i grzybów, bakterie gram-ujemne oraz gronkowce.

Mikroorganizmy emitowane do powietrza pochodzą z wydychanego przez psy powietrza oraz z ich odchodów i śliny, ale również z sąsiadującego Zakładu MPO, na terenie którego są składowane i przesypywane odpady. Po wykonaniu badań stwierdzono obecność wszystkich wyżej wymienionych drobnoustrojów na terenie schroniska. Największe zanieczyszczenie powietrza pod względem mikrobiologicznym stwierdzono w punktach pomiarowych graniczących z Zakładem MPO. W pozostałych punktach pojawiały się sporadycznie przekroczenia. Po podsumowaniu wyników wysunięto następujące wnioski: zanieczyszczenie powietrza w mniejszym stopniu emitują zwierzęta przebywające w Schronisku, a w większym stopniu Zakład MPO. Nadmierne wytwarzanie zanieczyszczeń może negatywnie oddziaływać na stan zdrowia

zwierząt i ludzi. W celu wyeliminowania nadmiernej emisji należy zaprojektować ekran zabezpieczający przed przedostawaniem się na teren Schroniska pyłów z osadzonymi mikroorganizmami, z terenu Zakładu MPO.

1. Wstęp

Powietrze atmosferyczne jest ważnym elementem środowiska naturalnego i istotna jest dbałość o jego czystość. Przez nadmierną emisję gazów, pyłów czy również drobnoustrojów dochodzi do poważnego zanieczyszczenia atmosfery. Przyczynia się do tego wiele czynników, między innymi szybki rozwój przemysłu spożywczego i transportowego, a ogólnie rozwój cywilizacyjny. Ważne jest zachowanie równowagi pomiędzy nastającymi zmianami antropogenicznymi a środowiskiem naturalnym.

Mikroorganizmy rozpowszechnione są na całej kuli ziemskiej w różnych strefach klimatycznych i środowiskach. Niezliczone ilości drobnoustrojów występują głównie w wodzie i glebie, natomiast powietrze atmosferyczne nie jest naturalnym środowiskiem do bytowania tych organizmów. Decyduje o tym przede wszystkim brak substancji odżywczych i wody. Powietrze stanowi jedynie miejsce do przemieszczania się i tymczasowego przebywania drobnoustrojów. Przedostają się one do powietrza z wody, gleby, roślin i organizmów ludzi i zwierząt, oraz z obiektów takich jak oczyszczalnie ścieków, składowiska odpadów.

Drobnoustroje tworzące naturalne tło w środowisku nie oddziałują negatywnie na stan zdrowia ludzi i zwierząt w przeciwieństwie do mikroorganizmów chorobotwórczych mogących powodować zagrożenia epidemiologiczne. Konieczna jest stała kontrola czystości mikrobiologicznej powietrza atmosferycznego w celu systematycznego

wykrywania bakterii i grzybów oraz ustalania stopnia zanieczyszczenia tymi drobnoustrojami. Najważniejszymi miejscami podlegającymi stałym kontrolom są te, w których przebywają ludzie i zwierzęta. Do nich zaliczyć można Schronisko dla zwierząt w Białymstoku, ponieważ duże ilości drobnoustrojów zagrażają zdrowiu przebywających tam i zwierząt i pracowników.

1.1. Powietrze jako element środowiska

Powietrze atmosferyczne do wysokości 100 km składa się z: azotu (78,09%), tlenu (20,95%), argonu (0,93%), dwutlenku węgla (od 0,02% do 0,04%), niewielkich ilości: neonu, helu, kryptonu, ksenonu, a także niewielkich zmiennych ilości metanu, wodoru, podtlenku azotu, ozonu, tlenków azotu, amoniaku, związków siarki, pary wodnej, kryształów lodu [1, 2].

Powietrze jest narażone na szereg zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych pochodzących ze źródeł naturalnych i antropogenicznych. Zanieczyszczenie powietrza można zdefiniować jako wszelkie substancje (gazy, ciecze, ciała stałe), które znajdują się w powietrzu atmosferycznym, nie stanowiąc jego naturalnego składu. Substancje będące naturalnymi składnikami powietrza występujące w znacznie zwiększonych ilościach również mogą zanieczyszczać atmosferę. Zanieczyszczenia powietrza można podzielić na cztery grupy. Pierwszą grupę stanowią gazy i pary związków chemicznych, np. tlenki węgla (CO , CO_2), siarki (SO_2 , SO_3) i azotu (NO_x), fluor (F), ozon (O_3), radon (Rn), amoniak (NH_3), węglowodory i ich pochodne, fenole, tlenek ołowiu, siarkowodór. Do drugiej grupy zalicza się drobne kropelki cieczy, np. kropelki zasad, kwasów, rozpuszczalników, natomiast do trzeciej drobne ciała stałe, np. popioły, pyły, związki metali ciężkich, sadze, stałe

związki organiczne, azbest, pestycydy. Czwartą grupę stanowią mikroorganizmy, których ilość i rodzaj nie są charakterystyczne dla naturalnego składu powietrza – bakterie, wirusy i zarodniki grzybów wraz z produktami ich metabolizmu. Oprócz zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych występują dosyć często zanieczyszczenia akustyczne dotyczące głównie dużych miast, w których natężenie hałasu wynosi 65 - 75 dB. Zanieczyszczenia chemiczne pierwszej, drugiej i trzeciej grupy pochodzą ze źródeł sztucznych takich jak: przemysł wydobywczy, hutniczy, energetyczny, motoryzacyjny, chemiczny i farmaceutyczny. Pyły mogą również pochodzić z naturalnych źródeł np.: z meteorytów, komet, wybuchów wulkanów, z procesów naturalnego wietrzenia skał, z roślin. Obecnie zdecydowana większość państw opiera swój przemysł energetyczny na źródłach nieodnawialnych, którym towarzyszy emisja szkodliwych produktów spalania. Wszystkie wymienione źródła i rodzaje zanieczyszczeń powietrza są istotne, ponieważ wywierają ujemny wpływ na środowisko i wszelkie organizmy żywe je zamieszkujące [1,3].

1.2. Mikrobiologia powietrza

1.2.1. Aerozole biologiczne

Aerozol biologiczny składa się z cząstek biologicznych zawieszonych w powietrzu i tworzących w nim układ koloidalny. Każdy koloid jest układem, w którym w ośrodku rozpraszającym (dyspersyjnym) znajdują się cząstki składnika rozproszonego o wielkości pośredniej między molekułami, a cząstkami widocznymi gołym okiem. W przypadku aerozoli biologicznych ośrodkiem dyspersyjnym jest powietrze (lub inny gaz), natomiast fazą rozproszoną są mikroorganizmy.

Drobnoustroje sporadycznie występują w powietrzu samodzielnie. Przeważnie są one związane z cząstkami pyłu lub kropelkami cieczy np. wody, śliny, dlatego cząstki bioaerozolu często przekraczają rozmiarami same mikroorganizmy i mogą występować w postaci dwóch faz. Pierwsza faza to faza pyłowa powstająca na przykład dzięki ruchom powietrza unoszącym kurz. Natomiast druga to faza kropelkowa wynikająca z kondensacji pary wodnej lub kichania. Cząstki pyłu są zwykle większe od kropelek i szybciej się osadzają (sedymentują). Wiąże się z tym różnica w zdolności penetracji układu oddechowego; kropelki bioaerozolu docierają do pęcherzyków płucnych, natomiast cząstki pyłu najczęściej są zatrzymywane w górnym odcinku dróg oddechowych. Poza tym liczba drobnoustrojów związanych z jedną fazą pyłową jest większa niż w przypadku fazy kropelkowej [4, 5, 6].

1.2.2. Skład i podział bioaerozolu

W skład aerozoli biologicznych wchodzi pojedyncze spory, pyłki roślin, komórki bakteryjne lub wirusy; agregaty utworzone z kilku spor, komórek lub innego materiału biologicznego (np. alergenów ssaków); produkty lub fragmenty grzybn, zarodniki grzybów i komórek bakteryjnych (np. endotoksyny, mikotoksyny); materiał biologiczny unoszony samoistnie lub niesiony przez większe cząstki niebiologiczne (np. cząstkę pyłu) [6].

Do najczęściej występujących drobnoustrojów należą grzyby strzępkowe, głównie z rodzajów *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucom* i *Rhizopus*, *Aureobasidium*, *Acremonium*, *Absidia*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Ulocladium*. Mają znaczną przewagę w powietrzu, ponieważ na ogół stanowią około 70% wszystkich mikroorganizmów.

Kolejne licznie występujące drobnoustroje to bakterie saprofityczne z rodzaju *Micrococcus* stanowiące 30-70% wszystkich bakterii obecnych w powietrzu oraz bakterie wytwarzające endospory z rodzaju *Bacillus* (20-60% bakterii). Nieliczną grupę stanowią promieniowce, trafiające do atmosfery głównie z gleby. Zaledwie 5% ogółu drobnoustrojów wyizolowanych z powietrza stanowią drożdże, przeważnie z rodzaju *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Saccharomyces*. Mikroorganizmy chorobotwórcze w powietrzu atmosferycznym występują sporadycznie, w przeciwieństwie do powietrza pomieszczeń zamkniętych, w których przebywają ludzie i zwierzęta [5].

Aerozole biologiczne można podzielić na dwa różne sposoby. Pierwszy podział wyróżnia bioaerozole naturalne i sztuczne z wyodrębnieniem aerofitoplanktonu i aerozooplanktonu. Bioaerozole naturalne i sztuczne tworzą mikroorganizmy oraz cząstki roślinne i zwierzęce, ale sztuczne są pozyskiwane eksperymentalnie. Aerofitoplankton stanowią organizmy roślinne i ich cząstki znajdujące się w powietrzu w stanie rozproszonym – pyłki i inne cząstki roślinne oraz wirusy, bakterie, grzyby, przetrwalniki glonów, porostów, mchów, natomiast aerozooplankton to niewielkie organizmy zwierzęce takie jak: jajeczka robaków pasożytniczych i wolnożyjących, owadów, przetrwalniki i cysty pierwotniaków. Z kolei drugi podział dzieli wszystkie bioaerozole na saprofityczne, zakaźne i mieszane, czyli dwa powyższe połączone ze sobą. Aerozole saprofityczne są odpowiedzialne za pogorszenie stanu higienicznego powietrza, natomiast zakaźne wywołują wiele chorób u roślin, zwierząt i ludzi oraz odgrywają znaczącą rolę przy powstawaniu chorób alergicznych, zakaźnych oraz epidemii [1].

1.2.3. Frakcje cząstek aerozoli biologicznych

Aerozole biologiczne występujące w powietrzu można podzielić na cztery frakcje w zależności od wielkości cząsteczek bioareozoli. Pierwszą fazą jest faza płynna gruboziarnista o wielkości cząstek większych niż 100 μm . Cząsteczki tej fazy szybko sedymentują, opadając z prędkością ok. 0,3 m/s. Faza druga to płynna drobnoziarnista frakcja mieszcząca się w granicach od 100 do 50 μm , istotna w zakażeniach aerogennych. Przy suchym powietrzu kropelki tej fazy szybko wysychają przechodząc w fazę jądrowo-kropelkową. Faza płynna jądrowo-kropelkowa sięgająca rozmiarów 1-50 μm przedostaje się do powietrza w postaci kropel wyrzucanych przy kichaniu, parskanii, wydawaniu głosu, a także zawiera kropelki fazy drobnoziarnistej po odparowaniu. Nawet przy niewielkim ruchu powietrza cząstki nie opadają, ale są przenoszone na duże odległości. Tą drogą przenoszonych jest wiele chorób. Kolejną fazą jest pył bakteryjny mający wymiary 0,1-50 μm , który powstaje przez porywanie cząstek obornika, gleby z drobnoustrojami, ale również tworzą go kropelki połączone w powietrzu z pyłami pochodzącymi z wysychania kropelek zakażonej śliny czy śluzu. Są niebezpieczne z punktu widzenia epidemiologicznego, mogą utrzymywać się w powietrzu nawet kilka godzin [4].

1.2.4. Sposoby rozprzestrzeniania się mikroorganizmów w powietrzu

Rozprzestrzenianie się mikroorganizmów zależy głównie od prądów i zawartości w powietrzu różnych cząstek np. kurzu, pyłu, na których osadzone są drobnoustroje, endospory i inne formy przetrwalne umożliwiające przemieszczanie się na dalekie odległości. Wyróżnia się trzy sposoby rozprzestrzeniania się bioaerozoli

saprofitycznych i zakaźnych w powietrzu atmosferycznym. Pierwszym ze sposobów jest tzw. dynamiczna projekcja kropeł, powstała kosztem energii kinetycznej, którą krople uzyskują w momencie ich wyrzucania przy skurczu mięśni dróg oddechowych. Wraz ze wzrostem zużycia energii na przezwycięzenie oporu powietrza szybkość ruchu kropelek maleje i pod działaniem siły grawitacji opadają one na dół. Dystans, na jaki sięga projekcja dynamiczna, zależy od wielkości kropeł oraz od początkowej szybkości ich ruchu. Projekcja dynamiczna ma duże znaczenie przy rozprzestrzenianiu aerozoli bakteryjnych w fazie dyspersyjnej, w której przeważają cząsteczki o średnicy ponad 100 mikronów. Kolejny sposób rozprzestrzeniania się cząstek bioaerozoli saprofitycznych i zakaźnych w powietrzu jest związany z systemem wentylacyjno-klimatyzacyjnym pomieszczeń, z obecnością kanałów wymiennych i nawietrznych, szybów kursowania wind i innych. Za pomocą wentylacji rozprzestrzeniają się cząstki stanowiące drobnoziarnistą, w tym jądrowo-kropelkową fazę aerozolu biologicznego, a przede wszystkim tzw. pył bakteryjny. Opisany sposób rozprzestrzeniania się aerozolu przyczynia się do powstawania bardzo częstych i trudnych do zwalczania zakażeń wewnątrzszpitalnych, w sanatoriach i innych pomieszczeniach. Ostatnim sposobem rozprzestrzeniania się cząstek aerozolu bakteryjnego jest przenoszenie ich za pomocą prądów konwekcyjnych powietrza. W ten sposób rozprzestrzeniają się cząsteczki o średnicy poniżej 100 mikronów. Zasięg ich rozsiania przewyższa granice sfery projekcji dynamicznej. Wystarczy do ich przeniesienia niewielka siła wiatru, ponieważ im mniejsza jest wielkość cząstek, tym mniejsza szybkość. Jądra kropelkowe o średnicy 1-10 mikronów zdolne są do utrzymania się i zachowania życia

w powietrzu atmosferycznym przy szybkości jego ruchu wynoszącej przynajmniej 0,2 m na minutę [1, 7].

1.2.5. Występowanie mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym

Mikroorganizmy występujące w środowisku powietrznym mogą jedynie przebywać w nim przez pewien czas, a nie mogą pełnić żadnych funkcji życiowych między innymi rozmnażać się czy odżywiać. Powietrze atmosferyczne nie stanowi odpowiedniego środowiska do bytowania i rozwoju dla drobnoustrojów, jest albowiem pozbawione całkowicie substancji odżywczych, czyli przyswajalnego źródła węgla i bezpośredniego dostępu do wody, występuje niestabilność warunków fizycznych i chemicznych. Mikroorganizmy występujące w powietrzu atmosferycznym mają charakter allochtoniczny. Pochodzą z gleby i wody, ale również z organizmów ludzi i zwierząt [6, 8].

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne powietrza dzielą się na naturalne i związane z działalnością człowieka, czyli bytowe. Naturalne źródła to głównie gleba i woda skąd drobnoustroje przedostają się do atmosfery przez ruchy powietrza oraz organizmy zwierzęce i ludzkie. Ważniejszą rolę odgrywają źródła antropogeniczne, ponieważ w większych ilościach mogą emitować do atmosfery mikroorganizmy, w tym chorobotwórcze, znacznie przekraczając naturalne tło występujące w powietrzu. Źródła emisji bioaerozoli mogą być punktowe lub powierzchniowe. Do najważniejszych źródeł bytowych należą: oczyszczalnie ścieków, gospodarka odpadami, rolnictwo i przemysł rolno-spożywczy, kompostownie, ruch samochodowy oraz fermy hodowlane, schroniska dla zwierząt, ogrody zoologiczne, rezerваты przeznaczone do ochrony zwierząt [4].

Przeżywalność drobnoustrojów w powietrzu zależy od różnych czynników środowiskowych i specyfiki samego mikroorganizmu. W powietrzu atmosferycznym najdłużej przebywają formy, które dzięki swojej budowie lub składowi chemicznemu wykazują odporność na działanie niesprzyjających czynników środowiska takich jak: susza, działanie promieni słonecznych, wysoka temperatura, brak pożywienia, niekorzystne pH czy obecność toksyn. Wymienione czynniki w pewnych zakresach nie wywierają szkodliwego efektu umożliwiając rozwój mikroorganizmów. Z chwilą przekroczenia tych granic funkcje życiowe drobnoustrojów zostają ograniczone lub wstrzymane, nawet jeśli dotyczy to jednego z czynników, a pozostałe będą na poziomie optymalnym. Oprócz form komórkowych, w powietrzu krążą wirusy, spośród których największą odpornością charakteryzują się te, których nukleokapsyd jest otoczony osłonką np. wirus grypy. Natomiast wirusy o nieosłoniętym nukleokapsydzie wykazujące dużą stabilność to enterowirusy [4, 5, 9, 10].

1.2.6. Występowanie drobnoustrojów chorobotwórczych w powietrzu atmosferycznym

Wyróżnia się trzy grupy zagrożeń powodowanych obecnością drobnoustrojów w powietrzu atmosferycznym. Do pierwszej grupy zalicza się choroby zakaźne wirusowe, bakteryjne, grzybowe oraz pierwotniacze, do drugiej choroby alergiczne, a do ostatniej zatrucia spowodowane spożyciem endotoksyn i mikotoksyn. Bioaerozol zawieszony w powietrzu, po opadnięciu przedostaje się na powierzchnię skóry lub za pośrednictwem rąk do układu pokarmowego, a stamtąd do krwi i układu nerwowego [4, 5].

Choroby wirusowe powodowane są przez cząstki wirusowe, które po wnikięciu wraz z wdychanym powietrzem do układu oddechowego namnażają się w komórkach nabłonkowych górnych i dolnych dróg oddechowych. Część wirusów po namnożeniu penetruje elementy wchodzące w skład układu oddechowego powodując katar, zapalenie oskrzeli, płuc, a pozostała część atakuje inne organy. Najważniejsze choroby wirusowe to grypa wywoływane przez ortomyxowirusy, grypa rzekoma, świnka, odra, zapalenie oskrzelików i płuc u niemowląt (paramyxowirusy), różyczka (wirusy podobne do paramyxowirusów), choroby przeziębieniowe (rinowirusy i koronawirusy), ospa wietrzna (wirusy grupy opryszczki, pryszczycy (wirusy grupy picorna), zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, pleurodynia (enterowirusy), choroby układu pokarmowego i oddechowego (reowirusy), zapalenie gardła i płuc (adenowirusy).

Bakterie chorobotwórcze w podobny sposób jak wirusy dostają się do organizmu ludzkiego lub zwierzęcego. Często choroby wirusowe poprzedzają zakażenia bakteryjne, które również mogą wywoływać schorzenia wszystkich układów. Drogą powietrzną szerzy się wiele chorób, między innymi gruźlica płuc wywołwana przez prątki gruźlicy *Mycobacteriumtuberculosis*, zapalenie płuc (gronkowce, pneumokoki z gatunku *Streptococcuspneumoniae*, pałeczki z gatunku *Klebsiellapneumoniae*), angina, płonica, zapalenie gardła (paciorkowce), ropne zapalenie górnych i dolnych dróg oddechowych i zapalenie opon mózgowych (pleomorficzne pałeczki z gatunku *Haemophilusinfluenzae*), krztusiec (pałeczki z gatunku *Bordetellapertussis*), błonica (maczugowiec błonicy *Corynebacteriumdiphtheriae*), legionelloza (pałeczki z rodzaju *Legionella*), nokardioza (tlenowe promieniowce z rodzaju *Nocardia*).

Głównym źródłem chorób grzybowych przenoszonych przez powietrze jest gleba. Mikroorganizmy geofilne mają zdolność do keratynolizy, rozkładają białko obecne w zrogowaciałych wytworach naskórka np. paznokciach, we włosach, pazurach, sierści czy piórach. Dermatofity powodują grzybice powierzchniowe przez rozkład keratyny penetrują struktury naskórka np. *Microsporumaracemosum*, ale również wywołują grzybice głębokie po wnikięciu do narządu oddechowego np. aspergillozę (kropidlak popielaty *Aspergillus fumigatus*), kryptokokozę (drożdżak z gatunku *Cryptococcusneoformans*).

Człowiek i zwierzęta mogą się zakazić drogą wziewną pierwotniakami wytwarzającymi cysty odporne na wysychanie i promieniowanie słoneczne np. sporowcami z gatunku *Pneumocystiscarinii*. Inne mikroorganizmy oprócz człowieka i zwierząt atakują również rośliny uprawne, np. grzyb z typu podstawczaków *Pucciniagraminis* wywołuje chorobę zbóż – rdzę żdźbłową.

Mikroorganizmy powodują również choroby alergiczne, czyli nadmierną reakcję organizmu na obecność alergenów. Podczas tej reakcji immunologicznej dochodzi do nadprodukcji limfocytów B w odpowiedzi na wnikięcie antygeny. Po wytworzeniu zbyt dużej ilości immunoglobuliny i połączeniu się z alergenami następuje uwalnianie się z granulocytów i tzw. komórek tucznych różnych związków powodujących reakcje zapalne w postaci astmy oskrzelowej czy kataru siennego. Może też dojść do tworzenia się strąków uszkadzających tkankę w miejscu ich powstania powodując alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych. Występuje dużo drobnoustrojów przyczyniających się do wywołania alergii, a różnią się siłą działania alergizującego. Najbardziej uczulające są grzyby pleśniowe, termofilne promieniowce i pałeczki gram-ujemne Siła działania uczulających drobnoustrojów zależy od

rodzaju i wielkości mikroorganizmów oraz jego zagęszczenia. Częsteczki powyżej 10 μm są zatrzymywane w jamie nosowo-gardłowej powodując katar sienny np. zarodniki grzyba z rodzaju *Alternaria*, cząstki o średnicy 4-10 μm kumulują się w oskrzelach powodując astmę oskrzelową np. zarodniki grzyba z rodzaju *Cladosporium*, natomiast cząstki poniżej 4 μm wnikają w oskrzeliki i pęcherzyki płucne wywołując alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych np. grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*.

Drobnoustroje produkują toksyny, które zatruwają organizm ludzki i zwierzęcy. Endotoksyny budują ścianę komórkową bakterii gram-ujemnych, wykazują działanie toksyczne i alergiczne na organizmy ssaków. Potrafią zachować aktywność biologiczną nawet w martwych komórkach, są termofilne, a po wnikięciu do organizmu drogą wziewną powodują ostre odczyny zapalne w płucach, podrażnienie oczu, ból głowy i ostrą gorączkę. Ryzyko zakażenia dotyczy ludzi narażonych na wdychanie pyłów organicznych np. pyłu zbożowego zawierającego na powierzchni liczne pałeczki z gatunku *Erviniaherbicola*.

Grzyby pleśniowe wytwarzają mikotoksyny, najczęściej aflatoksyny przez kropidlaka żółtego (*Aspergillus flavus*), o działaniu silnie toksycznym, mutagennym, teratogennym i kancerogennym. Powodują najczęściej zatrucia pokarmowe, a przez ciągłe wdychanie nowotwory wątroby czy układu oddechowego [4, 5].

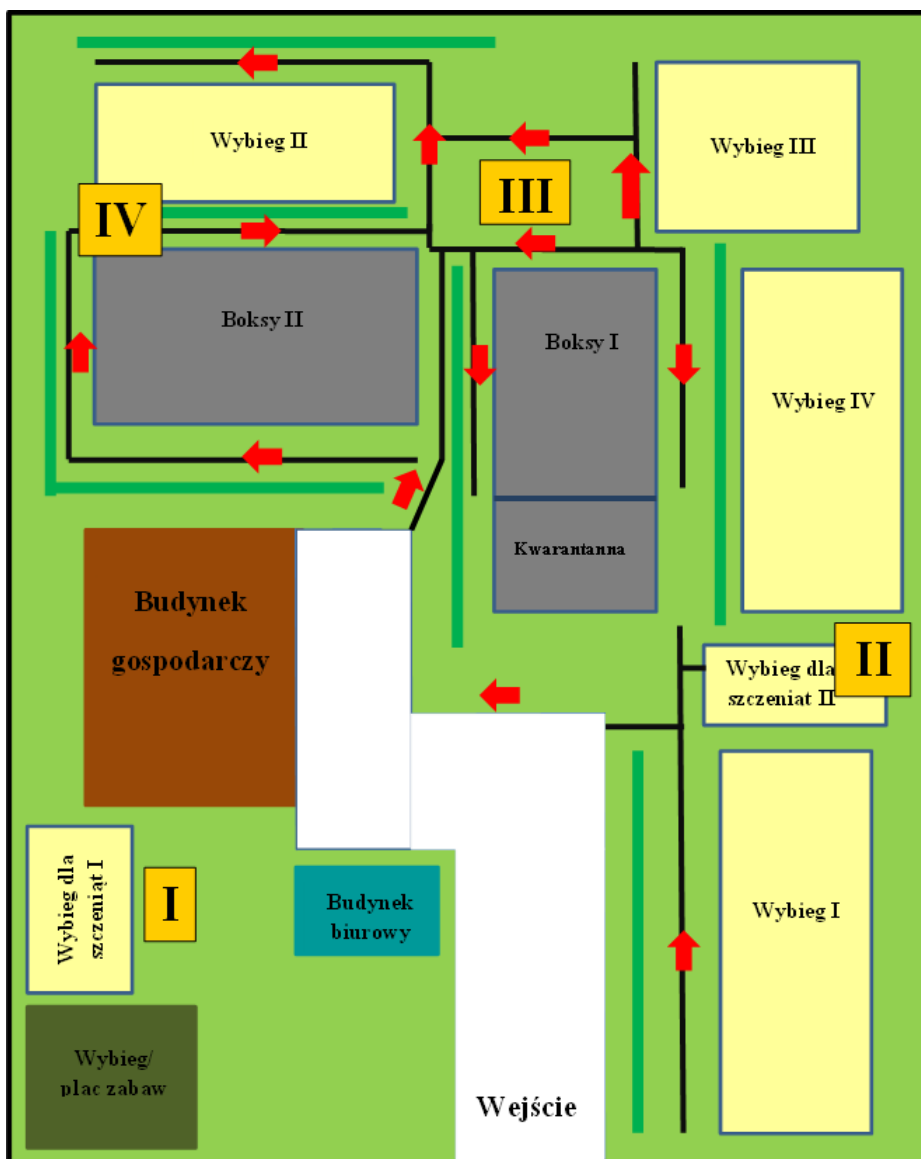
2. Teren i metodyka badań

2.1. Opis badanego miejsca i punktów pomiarowych

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono ocenę mikrobiologicznej czystości powietrza na terenie Schroniska dla zwierząt

w Białymstoku. Schronisko jest usytuowane w północno-wschodniej części Białegostoku przy osiedlu Pieczurki. Od północy sąsiaduje z Zakładem MPO, a od południa z przedsiębiorstwem usługowym metalurgiczno-dźwigowym. Budynki mieszkalne znajdują się w znacznej odległości. Na terenie Schroniska dla zwierząt w Białymstoku przebywają psy w liczbie około 300 osobników w pomieszczeniach i wybiegach do tego przeznaczonych. Na schemacie na Rys. 1 umieszczono wszystkie obiekty znajdujące się na terenie Schroniska. Dwa budynki znajdujące się w środkowej części obiektu są podzielone na boksy. Wybiegi oraz klatki dla dorosłych psów i oddzielnie dla szczeniąt są rozmieszczone na obrzeżach terenu. Na obszarze schroniska usytuowany jest również budynek biurowy, gospodarczy oraz wybieg do wyprowadzania psów.

Badania powietrza wykonywano w czterech punktach zaznaczonych na Rys. 1. Pierwszy punkt pomiarowy I, zlokalizowano pomiędzy wybiegami dla szczeniąt, miejscem do wyprowadzania psów i budynkiem gospodarczym, drugi zaś również przy wybiegu dla szczeniąt (drugim) usytuowanym w bliskim sąsiedztwie Zakładu MPO. Na trzeci punkt badań wybrano miejsce pomiędzy wybiegami dla psów dorosłych, a czwarty umieszczono pomiędzy boksami a wybiegami przy granicy z firmą metalurgiczno-usługową.



Rysunek 1. Plan Schroniska dla zwierząt w Białymstoku

Źródło: Opracowanie własne

2.2. Metodyka badań

Analizy mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza wykonano w okresie od maja do października 2015 roku, uwzględniając warunki meteorologiczne panujące w różnych porach roku. W ramach

badan, wykorzystujac do tego odpowiednie podloza oznaczano: ogolna liczbe bakterii, liczbe grzybow, liczbe gronkowcow manitolododatnich (rozkladajacych mannitol) i manitoloujemnych (z brakiem reakcji rozkladu mannitolu) oraz liczbe bakterii gram-ujemnych. Probki powietrza pobierano metoda zderzeniowa za pomoca mikrobiologicznego probnika powietrza typu MAS-100 Eco firmy Merck, zasysajac kazdorazowo scisle okreslona objetosc powietrza atmosferycznego na podloza przygotowane na plytkach Petriego. Przyrzad zasysa z duza szybkością wybrana objetosc powietrza, ktore uderzajac o powierzchnie pozywki stalej zmienia kierunek, skutkiem czego zawarte w nim mikroorganizmy, wypadaja z pradu powietrza, osadzajac sie na grzaskiej powierzchni podloza.

Po wykonaniu badan wszystkie plytki wkladano do cieplarek w celu wyhodowania kolonii. Grupy mikroorganizmow hodowano w przedzialach czasowych i temperaturach podanych w tabeli 1.

Tabela 1. Warunki prowadzenia hodowli

Oznaczenie	Rodzaj podloza	Czas inkubacji	Temperatura
Ogólna liczba bakterii	Agar odżywczy	24-48 godzin	26°C
Ogólna liczba grzybów	Sabourauda	2-4 dni	26°C
Liczba bakterii gram-ujemnych	Mac Conkley	48 godzin	37°C
Liczba gronkowców	Chapmana	48 godzin	37°C

Źródło: Opracowanie własne

Po odpowiednim czasie zliczano wyhodowane kolonie i okreslano ilosc drobnoustrojow w 1m³ powietrza korzystajac ze wzoru 1 [1].

$$A = \frac{a}{V} JTK / m^3 \quad (1)$$

gdzie:

A - ilość drobnoustrojów w 1m³ powietrza,

a - średnia ilość kolonii na płytkach,

V - ilość powietrza przepuszczanego przez aparat w m³.

Obecnie w Polsce nie obowiązują szczegółowe normy dopuszczalnych poziomów mikrobiologicznego skażenia powietrza. Otrzymane wyniki porównano do wcześniej obowiązującej Polskiej Normy, dzięki której określono poziom zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego na podstawie wskaźników zamieszczonych w tabeli 2 i 3 [11, 12].

Tabela 2. Ocena stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego w 1m³ ze względu na obecność bakterii

Ogólna liczba bakterii	Liczba				Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego
	Promieniowców	Pseudomonas- fluorescens	Gronkowców hemolizujących		
			Hemoliza typu		
			α	β	
poniżej 1000	10	brak	brak	Brak	Niezanieczyszczone
1000 - 3000	10 – 100	50 i poniżej	25 i poniżej	50 i poniżej	Średnio zanieczyszczone
powyżej 3000	powyżej 100	powyżej 50	powyżej 25	powyżej 50	Silnie zanieczyszczone

Źródło: opracowanie własne na podstawie Polskiej Normy PN-89/Z-04111-02

Tabela 3. Ocena stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego w 1m³ ze względu na obecność grzybów

Ogólna liczba grzybów w 1m ³ powietrza atmosferycznego	Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego
od 3000 – 5000	przeciętnie czyste powietrze atmosferyczne, zwłaszcza w okresie późnojesiennych i wczesnowiosennych
powyżej 5000 do 10000	zanieczyszczenie mogące negatywnie oddziaływać na środowisko naturalne człowieka
powyżej 10000	zanieczyszczenie zagrażające środowisku naturalnemu człowieka

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Polskiej Normy PN-89/Z-04111-03

3. Wyniki badań i dyskusja

W ramach niniejszej pracy wykonano mikrobiologiczne badania powietrza na terenie Schroniska dla zwierząt w Białymstoku, w okresie od maja do października. Charakterystycznymi punktami pomiarowymi były drugi i trzeci zlokalizowane blisko granicy z zakładem, który emituje zanieczyszczenia na teren schroniska, ponieważ nie ma od tej strony skutecznego ogrodzenia zabezpieczającego przed rozprzestrzenianiem się mikroorganizmów a jedynie siatka o średnich rozmiarach oczek. Tworzone zanieczyszczenia podczas przesypywania i prasowania odpadów komunalnych, przedostają się z łatwością na teren Schroniska negatywnie wpływając na stan zdrowia pracowników i zwierząt tam przebywających.

Wyniki oznaczania w całym okresie badań ogólnej liczby bakterii przedstawiono w tabeli 4. Czerwonym kolorem zaznaczono te wyniki,

które wskazują na średnie zanieczyszczenie powietrza (zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 2). W pierwszym punkcie pomiarowym odnotowano najwyższą wartość we wrześniu 1575 JTK/m³, najniższą w lipcu 70 JTK/m³. W pozostałych miesiącach wyniki nie przekraczały 500 JTK/m³. Natomiast w drugim punkcie pomiarowym największą wartość otrzymano w maju 2140 JTK/m³, najmniejszą we wrześniu 560 JTK/m³, a w kolejnych miesiącach czerwcu, lipcu i sierpniu ogólna liczba bakterii mieściła się w zakresie od 1305 do 2050 JTK/m³.

Tabela 4. Wyniki oznaczenia ogólnej liczby bakterii

Punkt pomiarowy	Ilość drobnoustrojów w 1 m ³ powietrza [JTK/m ³]				
	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień	Wrzesień
I	315	480	70	470	1575
II	2140	2050	1065	1305	560
III	555	970	570	885	380
IV	385	205	125	520	1090

Zródło: opracowanie własne

W pierwszym, trzecim i czwartym punkcie pomiarowym oznaczano bakterie w ilości świadczącej o nie zanieczyszczonym powietrzu, jedynie we wrześniu w punkcie IV nieznacznie została przekroczona wartość 1000 JTK/m³ powietrza, w punkcie I wyraźniej, co w obu przypadkach pozwalało ocenić powietrze jako średnio zanieczyszczone. W drugim punkcie pomiarowym natomiast, prawie w całym okresie badań uzyskiwano wyniki wskazujące na średnie bakteriologiczne zanieczyszczenie powietrza.

Punkty pomiarowy I i II są podobnie usytuowane, czyli pomiędzy wybiegami lecz pierwszy punkt jest przy granicy z zakładem metalurgiczno-usługowym, a drugi w bliskiej odległości od Zakładu

MPO. Na podstawie wyników w drugim punkcie pomiarowym oprócz emisji drobnoustrojów pochodzących od zwierząt dochodzi do przedostawania się zanieczyszczeń wywodzących się najprawdopodobniej z odpadów komunalnych znajdujących się na terenie Zakładu MPO. Potwierdzeniem dwóch źródeł emisji w drugim punkcie pomiarowym jest też to, że badania we wszystkich miesiącach, oprócz września były wykonywane podczas przesypywania odpadów w zakładzie. W tym czasie zaobserwowano w powietrzu duże natężenie pyłu nad terenem zakładu jak i również schroniska.

Kolejnym punktem charakterystycznym jest trzeci punkt pomiarowy. Nie wykryto w nim żadnych przekroczeń zawartych w Normie PN-89/Z-04111-02, aczkolwiek wartości we wszystkich miesiącach pomijając wrzesień były wysokie, a w czerwcu liczba bakterii mocno zbliżyła się do wartości granicznej dla strefy czystej i osiągnęła wartość 970 JTK/m^3 . Przyczyną dużej ilości bakterii w punktach II i III może być położenie tych punktów w bliskiej odległości od Zakładu MPO. Drugi punkt jest oddalony od zakładu o 2 m, a trzeci o 12 m. Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest to, że wartości w punkcie drugim i trzecim są znacznie większe od wyników uzyskanych w punktach I i IV znajdujących się po przeciwnej stronie. Otrzymane wyniki porównano z wynikami badań innych autorów. Bartoszewicz i Michalska dokonały badań ogólnej liczby bakterii na terenie osiedla sąsiadującego z Zakładem Utylizacyjnym w Gdańsku Wrzeszczu i w odległości 7 km od Zakładu. Badania przeprowadziły pod koniec kwietnia, w czerwcu, lipcu i we wrześniu. Wyniki otrzymane z pobieranych prób z osiedla osiągnęły najwyższą wartość w lipcu wynoszącą 930 JTK/m^3 , natomiast w odległości 7 km od zakładu najwyższy wynik w lipcu wynosił jedynie 46 JTK/m^3 , a najniższy

w czerwcu 6 JTK/m³. Z powyższych przytoczonych danych można stwierdzić iż zakłady zajmujące się przeładunkiem i utylizacją odpadów komunalnych w dużej mierze przyczyniają się do zanieczyszczenia powietrza.

W tabeli 5 przedstawiono wyniki oznaczenia ogólnej liczby grzybów. W pierwszym badanym miejscu największą wartość wykryto we wrześniu, a najmniejszą w maju i lipcu. W drugim miejscu sąsiadującym z Zakładem MPO w maju, czerwcu i wrześniu liczba grzybów przekroczyła 1000 JTK/m³, natomiast w lipcu i sierpniu była zdecydowanie niższa. W trzecim punkcie pomiarowym w maju zanotowano najmniejszą wartość, a największą w czerwcu sięgającą aż 7000 JTK/m³. Na podstawie nieaktualnej, ale jedynej w Polsce normy PN-89/Z-04111-03 (Tabela 3) w punkcie trzecim występuje zanieczyszczenie mogące negatywnie oddziaływać na środowisko naturalne człowieka. Tak duża zawartość grzybów w powietrzu mogła pochodzić z pyłów wydobywających się z przesypywanych w trakcie badań odpadów. Podmuchy wiatru przemieszczały zanieczyszczenia na teren Schroniska.

Tabela 5. Wyniki oznaczenia ogólnej liczby grzybów

Punkt pomiarowy	Ilość grzybów w 1 m ³ powietrza [JTK/m ³]				
	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień	Wrzesień
I	250	510	210	655	1065
II	1350	1960	340	500	1335
III	105	7000	300	775	2075
IV	70	360	40	920	1565

Źródło: Opracowanie własne

W tabeli 6 przedstawiono wyniki wykrywania bakterii gram-ujemnych w całym okresie badań. Bakterie te wykrywano sporadycznie

w pojedynczych punktach pomiarowych, maksymalnie w ilości 250 JTK/ m³ w maju w punkcie II.

Tabela 6. Wyniki oznaczenia ogólnej liczby bakterii gram-ujemnych

Punkt pomiarowy	Ilość gram-ujemnych w 1 m ³ powietrza [JTK/m ³]				
	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień	Wrzesień
I	n. w	10	n. w	n. w	n. w
II	250	10	n. w	n. w	n. w
III	n. w	10	n. w	n. w	n. w
IV	n. w	n. w	n. w	30	n. w

Źródło: opracowanie własne

W tabeli 7 zestawiono wyniki oznaczenia liczby gronkowców. W pierwszym punkcie pomiarowym najwięcej tych bakterii było w lipcu i wrześniu, najmniej w czerwcu i sierpniu. W drugim punkcie pomiarowym w czerwcu wykryto najwyższą liczbę gronkowców (720 JTK/m³), natomiast w sierpniu nie wykryto ich wcale. Trzecie miejsce wyróżnia się największą wartością przypadająca na czerwiec (1910 JTK/m³), w pozostałych miesiącach liczba gronkowców była znacznie mniejsza i wahała się w granicach od 30 do 200 JTK/m³. W ostatnim punkcie pomiarowym liczba gronkowców w całym okresie badań wahała się nieznacznie.

Tabela 7. Wyniki oznaczenia liczby gronkowców

Punkt pomiarowy	Ilość gronkowców w 1 m ³ powietrza [JTK/m ³]				
	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień	Wrzesień
I	n. b	20	620	30	130
II	n. b	720	180	n. w	20
III	n. b	1910	50	200	30
IV	n. b	110	30	30	50

Źródło: Opracowanie własne

Na podstawie Polskiej Normy PN-89/Z-04111-02 silny stopień zanieczyszczenia bakteriologicznego powyżej 75 JTK/m^3 odnotowano w różnym czasie we wszystkich punktach pomiarowych. Przy pierwszym punkcie pomiarowym trzymane są szczenięta, które w okresie wiosenno – letnim trafiają do schroniska częściej niż w pozostałych porach roku. Ciągła rotacja tych zwierząt wpływa na zwiększenie emisji drobnoustrojów. Szczenięta są bardziej narażone na zakażenia mikroorganizmami, ponieważ nie mają jeszcze dobrze wykształconego układu odpornościowego. Do organizmów zwierzęcych gronkowce mogą się dostać poprzez kontakt z glebą czy wodą powierzchniową, ponieważ drobnoustroje te najczęściej zasiedlają te środowiska, mogą być też przenoszone na sierści zwierząt. Silny stopień zanieczyszczenia gronkowcami w punkcie II i III mógł być spowodowany docierającym na teren schroniska z Zakładu MPO pyłem powstającym podczas przesypywania ścięci.

4. Wnioski

Na podstawie otrzymanych wyników badania powietrza na terenie Schroniska dla zwierząt w Białymstoku sformułowano następujące wnioski:

1. Największą liczbę bakterii stwierdzono w drugim punkcie pomiarowym w maju 2140 JTK/m^3 , najmniejszą zaś w pierwszym punkcie w lipcu 70 JTK/m^3 .
2. Najwięcej grzybów wykryto w trzecim punkcie pomiarowym w czerwcu 7000 JTK/m^3 , a najmniej w czwartym punkcie w lipcu 40 JTK/m^3 .
3. Bakterie gram-ujemne pojawiały się w miejscach o charakterystycznym źródle emisji, czyli w punkcie pierwszym,

drugim i trzecim. Najwięcej bakterii gram ujemnych wykryto w maju w punkcie drugim.

4. Największą liczbę gronkowców odnotowano w trzecim punkcie pomiarowym w czerwcu (1910 JTK/m^3), natomiast najmniejszą wartość uzyskano również w czerwcu w pierwszym punkcie (20 JTK/m^3).
5. Na podstawie wcześniejszych rozporządzeń dotyczących dopuszczalnych wartości zanieczyszczeń bakteriologicznych w 1 m^3 powietrza atmosferycznego PN-89/Z-04111-02 i dopuszczalnej liczby grzybów w 1 m^3 powietrza atmosferycznego PN-89/Z-04111-03 określono stopień zanieczyszczenia powietrza. Najwięcej przekroczeń norm pod względem zanieczyszczenia mikrobiologicznego wykazały punkty drugi i trzeci. Oba miejsca występują w bliskiej odległości od Zakładu MPO. Drugi punkt bliższy granicy z zakładem wykazuje częstsze przekroczenia wytycznych zawartych w rozporządzeniu niż punkt trzeci. W punkcie pomiarowym numer jeden wydzielanie mikroorganizmów do atmosfery jest spowodowane dużą rotacją szczepień, a w czwartym punkcie brakiem cyrkulacji powietrza.
6. Ważnym źródłem drobnoustrojów jest Zakład MPO graniczący ze schroniskiem emitujący znaczne ilości mikroorganizmów do powietrza atmosferycznego, a tym samym na teren schroniska.
7. Optymalnym rozwiązaniem mającym na celu ograniczenia przedostawania się drobnoustrojów na teren Schroniska dla zwierząt w Białymstoku jest postawienie ekranu zabezpieczającego wzdłuż granicy z Zakładem MPO.

Literatura:

1. Krzysztofik B. *Mikrobiologia powietrza*. Wydawnictwo Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1992.
2. Błaszczuk M. K. *Mikrobiologia środowisk*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 2010.
3. <http://www.ekoproblemy.2ap.pl/zanpow.htm> [3.10.2015]
4. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawełczyk A. *Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2005.
5. Walczak M., Burkowska A., SwiontekBrzezinska M., Kalwasińska A. *Podstawy mikrobiologii w teorii i praktyce*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 2013.
6. Chmiel Abef M. J., Frączek BF K., Grzyb EF J. *Problemy monitoringu zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza. Woda, Środowisko, Obszary wiejskie*. Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Mikrobiologii, Kraków, 2015.
7. Różalski A. *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej*. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 2004.
8. Bobrowski M. (red). *Biologia sanitarna. Materiały pomocnicze do ćwiczeń*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok, 2002.
9. Redakcja naukowa Baj J., Markiewicz Z. *Biologia molekularna bakterii*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 2012.
10. Kunicki-Goldfinger W. J. H. *Życie bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006.
11. PN-89/Z-04111/02. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu

atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną. Warszawa. PKN.

12. PN-89/Z-04111/03. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną. Warszawa. PKN.

inż. Łukasz Suproń¹⁾, dr inż. Irena Kaszkowiak
Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii
ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok
¹⁾lukasz.supron@wp.pl

Stan sanitarny wód rzeki Supraśl w obrębie kąpieliska w Michałowie

*The sanitary condition of the river Supraśl within watering place
in Michałowo*

Słowa kluczowe: mikroorganizmy wodne, stan sanitarny wód, wody powierzchniowe

Keywords: aquatic microorganisms, sanitary condition of water, surface water

Streszczenie: W niniejszej pracy przedstawiono ocenę stanu sanitarnego wód rzeki Supraśl w obrębie Zbiornika Małej Retencji Wodnej w Michałowie, który w okresie letnim pełni m.in. funkcję kąpieliska miejskiego. Próbkę wody do badań pobierano z 3 stanowisk zlokalizowanych na fragmencie rzeki Supraśl, odpowiednio przed kąpieliskiem, zaraz za nim oraz w dalszej odległości od kąpieliska. W wodach oznaczano liczbę bakterii grupy *coli* typu ogólnego i termotolerancyjnego, paciorkowców kałowych oraz ogólną liczbę bakterii w 26°C. Po analizie uzyskanych wyników stwierdzono, że stan sanitarny rzeki Supraśl uzależniony był w głównej mierze od pory roku. Ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego i typu termotolerancyjnego znacznie wahała się, a w przypadku paciorkowców kałowych i ogólnej liczby bakterii, otrzymywane wyniki były zbliżone, a ich rozrzut niewielki. Średnio, największą ilość bakterii wskaźnikowych wykrywano latem, toteż, wody rzeczne w tym okresie nie spełniały norm stawianych kąpieliskom, a więc mogły negatywnie wpływać na czystość sanitarną samego kąpieliska. Większość wód zaklasyfikowano do kategorii A2. Dbłość o czystość rzeki i jej stały monitoring, może w dużym stopniu przyczynić się do poprawy jakości wód w kąpielisku.

1. Wstęp

Istotnym źródłem wód słodkich są ciekły płynące. Wody rzeczne wykorzystywane są zarówno w celach gospodarczych, w rolnictwie, a także mogą zasilać inne obiekty, jak zbiorniki retencyjne. Jednym z nich jest Zbiornik Małej Retencji Wodnej w Michałowie na rzece Supraśl, który oprócz podstawowych funkcji przypisywanych takim zbiornikom, w okresie letnim dodatkowo pełni rolę kąpieliska miejskiego.

Stan czystości wód powierzchniowych jest okresowo badany, czym zajmują się odpowiednie instytucje (np. sanepidy). Dokonywanie systematycznej oceny stanu sanitarnego wód, w tym przypadku kąpieliska, jak i zasilającego go cieku jest niezwykle istotne. Kąpiel w zanieczyszczonej wodzie może zagrażać zdrowiu ludności i powodować u nich różnego rodzaju wysypki, alergie czy choroby. Dlatego ważnym zadaniem jest informowanie społeczeństwa o możliwości lub zakazie zażywania kąpeli, regularne przeprowadzanie badań w samym kąpielisku oraz w szczególności w jego otoczeniu i eliminowanie ewentualnych źródeł zanieczyszczeń.

Zanieczyszczenia wód powierzchniowych mogą mieć zarówno pochodzenie naturalne, jak i antropogeniczne. Mogą być widoczne „gołym okiem”, co może wskazywać na ich silne zanieczyszczenie lub być niewidoczne, wymagające laboratoryjnej oceny. Jednym z rodzajów zanieczyszczeń, są zanieczyszczenia powodowane przez mikroorganizmy. Stanowią je drobnoustroje, które przedostają się do wód np. wraz ze spływem powierzchniowym z glebą, poprzez zrzuty nieoczyszczonych ścieków, czy przez bezpośrednie skażenie odchodami. Woda zasilana przez takie źródła zanieczyszczeń, może zawierać w sobie różne mikroorganizmy, w tym również chorobotwórcze. Ich obecność

w wodzie określa się pośrednio poprzez wykrywanie w wodzie organizmów wskaźnikowych. Organizmy wskaźnikowe są stałymi mieszkańcami przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt stałocieplnych i stanowią nieodłączną część ich mikroflory jelitowej. Należą do nich głównie pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*), bakterie z grupy *coli*, paciorkowce kałowe tzw. enterokoki i bakterie z rodzaju *Clostridium*. Ich obecność w wodzie jest bardzo ważnym sygnałem świadczącym o zanieczyszczeniu tych zbiorników i w żaden sposób nie powinien zostać zlekceważony. Wymienione bakterie są kluczowe dla stanu sanitarnego wody i mogą wskazywać na występowanie także innych rodzajów drobnoustrojów, w tym groźnych chorobotwórczych. Zbyt duża ilość takich mikroorganizmów może ograniczać lub nawet zakazywać wykorzystywanie ich do różnych celów, zwłaszcza kąpieliskowych, gdzie następuje bezpośredni kontakt skażonej wody z ciałem.

Częste, ponadnormatywne ilości bakterii z grupy *coli* i *E.coli* obserwowano w Zbiorniku Małej Retencji Wodnej w Michałowie prawie od początku jego istnienia. Ponadto, niejednokrotnie w zbiorniku tym występowały zakwity sinic. Potwierdzają to kontrole przeprowadzane w latach 2009-2014 przez Powiatową Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Białymstoku [1]. Ponadnormatywne ilości bakterii występujące w zbiorniku mogą sugerować, że na okolicznym terenie znajdować się może stałe źródło zanieczyszczenia, ale trudno jest określić, czy konkretnie jedno. Na występowanie dużych ilości bakterii typu kałowego może składać się wiele różnych, potencjalnych źródeł zanieczyszczeń, często nakładających się na siebie. Z pewnością, na uwagę zasługuje zasilająca kąpielisko rzeka Supraśl, która może nieść wraz ze swoimi wodami duże ilości zanieczyszczeń, w tym pochodzenia jelitowego. W pracy, podjęto próbę zbadania rzeki w ujęciu

mikrobiologicznym, w obrębie wspomnianego kąpieliska, aby ocenić stan sanitarny wód wpływających do zbiornika oraz wypływających z niego. Jest to szczególnie ważne, ponieważ jakość niesionych wód rzecznych może bezpośrednio wpływać na stan i czystość kąpieliska i odwrotnie, wody kąpieliska mogą wpływać na jakość i stan sanitarny wód Supraśli w jej dalszych odcinkach.

Celem pracy jest określenie stanu sanitarnego rzeki Supraśl w obrębie kąpieliska miejskiego w Michałowie, na przestrzeni wiosny, lata i jesieni w roku 2015, ustalenie prawdopodobnych przyczyn uzyskanych wyników oraz ocena wpływu wód rzecznych na czystość kąpieliska i kąpieliska na wody Supraśli.

2. Teren i metodyka badań

2.1. Charakterystyka obiektów badawczych

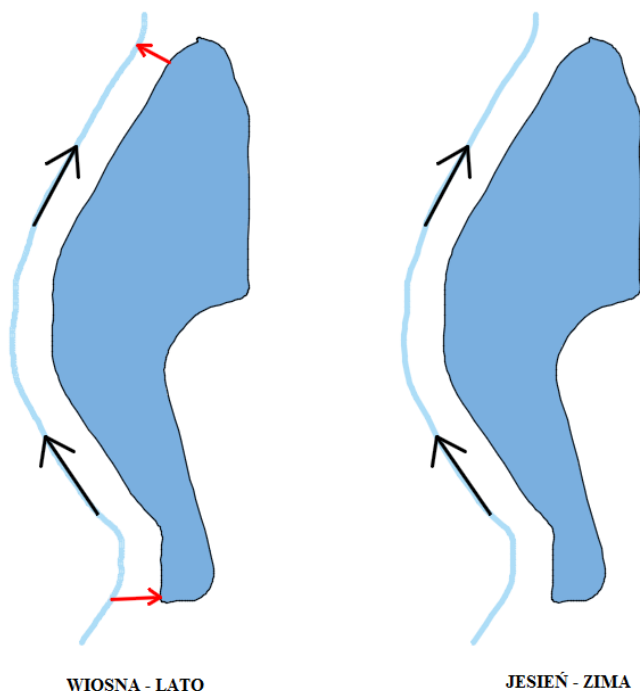
Obiektem badawczym w niniejszym opracowaniu jest rzeka Supraśl. To właśnie wody tej rzeki podlegały badaniom i dla niej został określony stan sanitarny wód. Ciek ten, znajduje się we wschodniej części województwa podlaskiego i stanowi jeden z ważniejszych dopływów Narwi. Źródło rzeki ma miejsce na północ od miejscowości Topolany w obszarze bagien i torfowisk [2]. Dalej Supraśl płynie w kierunku wschodnim, przez wieś Mościska, pośród użytków zielonych o podłożu torfowym i murszowym oraz miejscami pośród gleb leśnych, a następnie dociera do obrzeży Michałowa i zbiornika małej retencji, po czym kieruje się na północ. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że prędkość przepływu wody jest bardzo niska, rzędu kilku cm/s, a dno rzeki w obszarze badań jest muliste.

W bezpośrednim sąsiedztwie badanego odcinka rzeki Supraśl położony jest zbiornik retencyjny, którego wody i sposób ich użytkowania mogą mieć istotny wpływ na jakość wód w rzece. Usytuowany został na obrzeżach Michałowa, w zachodniej części miejscowości, na 94 kilometrze rzeki. Powstał w 2008 roku, jego powierzchnia wynosi 2,19 ha, pojemność 41 tys. m³, a średnia głębokość 1,88 m. W obszarze zalewu zostało wyodrębnione kąpielisko, którego powierzchnia sięga około 0,2 ha. Główną funkcją zbiornika jest magazynowanie wody na potrzeby rolnictwa w czasie niskich stanów wody w rzece. Ma również pełnić funkcję ekologiczną, przeciwpowodziową i przeciwpożarową oraz wzbogacać istniejący krajobraz. Wokół zbiornika, szczególnie w okresie letnim, rozwija się turystyka, a zbiornik pełni funkcję kąpieliskową dla mieszkańców gminy [3].

2.2. Rzeka Supraśl jako podstawowe źródło wód dla zbiornika retencyjnego

Powiązanie Zbiornika Małej Retencji Wodnej w Michałowie z rzeką Supraśl jest bardzo istotne. Ciek ten stanowi podstawowe źródło wód dla zbiornika retencyjnego. Zbiornik połączony jest z rzeką w dwóch miejscach – na wlocie wód (budowla wpustowa wraz z jazem piętrzącym) i wylocie (budowla upustowa), a wody z rzeki do zalewu i odwrotnie są transportowane za pomocą podziemnych rurociągów. W okresie wiosennym i letnim, budowle łączące rzekę ze zbiornikiem są otwarte a woda swobodnie przez nie przepływa. W okresie jesienno-zimowym wpust wody z rzeki jest zamknięty a jaz piętrzący na ten okres jest wyłączony z eksploatacji. Upust natomiast jest otwarty i następuje opróżnianie zbiornika do pewnego wyznaczonego poziomu. W takim

stanie akwen utrzymuje się do okresu wiosennego, w którym kanały ponownie są otwierane, a wody rzeki i zbiornika mieszają się swobodnie. Na Rysunku 1. przedstawiono schemat obiegu wody pomiędzy ciekim a zbiornikiem retencyjnym w poszczególnych porach roku. Kolorem czarnym oznaczono naturalny bieg rzeki, a kolorem czerwonym wody wpływające i wypływające z zalewu [3].



Rysunek 1. Schemat obiegu wody pomiędzy rzeką Supraśl a zbiornikiem retencyjnym

Źródło: Opracowanie własne

2.3. Opis stanowisk i miejsc poboru próbek

Obszar badań obejmuje fragment rzeki Supraśl o długości ok. 1,2 km w obrębie Zbiornika Małej Retencji Wodnej w Michałowie, który spełnia m.in. funkcję kąpieliska miejskiego. Wyznaczono trzy stanowiska na wspomnianym odcinku rzeki, a ich lokalizację przedstawia Rysunek 2.



Rysunek 2. Lokalizacja stanowisk badawczych, miejsce poboru oznaczono kolorem czerwonym

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [4]

Punkty kontrolne zostały usytuowane przy głównych drogach dojazdowych do miejscowości Michałowo, w pobliżu mostów. Odległość między 1 i 2 stanowiskiem wynosi ok. 620 m a pomiędzy 2 i 3 ok. 570 m. Punkty wyznaczono w taki sposób, aby przedstawić stan sanitarny wód wybranego odcinka rzeki przed zbiornikiem retencyjnym, zaraz po nim oraz w dalszej odległości od niego.

Stanowisko 1 jest najbardziej wysunięte na południe. Poziom wody w rzece w każdej porze roku jest tu najwyższy spośród wszystkich stanowisk, a koryto zostało sztucznie poszerzone (szerokość ok. 4 - 4,5 metra, głębokość ok. 0,6 - 0,7 metra). Wokół miejsca poboru znajdują się rozległe użytki zielone o podłożu murszowo - torfowym i prowadzony

jest wypas bydła. Nad punktem poboru prób wody znajduje się linia energetyczna. Najbliższe domostwo znajduje się ok. 100 metrów od stanowiska, a droga przy moście jest mało ruchliwa. Stanowisko 1 w okresie wiosennym przedstawiono na fotografii na Rysunku 3.



Rysunek 3. Stanowisko nr 1 w okresie wiosennym

Źródło: Opracowanie własne

Stanowisko 2 znajduje się zaraz za zbiornikiem retencyjnym, przy drodze o średnim natężeniu ruchu. Rzeka w tym miejscu jest dość płytka (głębokość do 0,3 m), a jej szerokość ma ok. 3 metry. Dno rzeki jest tu pokryte liczną roślinnością wodną. Kilkanaście metrów od punktu poboru znajduje się gminne targowisko oraz organizowane są imprezy cykliczne. Wokół stanowiska znajdują się użytki zielone o podłożu torfowym i lasy mieszane (głównie łęgi). W toni wodnej zaobserwowano wyrzucone odpady w postaci puszek i plastikowych opakowań. W okresie letnim i jesiennym rozwija się licznie roślinność pływająca. Rysunek 4. prezentuje stanowisko nr 2 w okresie letnim.



Rysunek 4. Stanowisko nr 2 w okresie letnim

Źródło: Opracowanie własne

Stanowisko 3 znajduje się w odległości ok. 0,5 km od zbiornika małej retencji. Rzeka jest w tym miejscu nieznacznie głębsza niż przy stanowisku 2 (do 0,5 metra). Szerokość rzeki dochodzi do 3 metrów. W wodzie wiosną i latem znajdowały się często resztki po skoszonej trawie i sitowiu. Z jednej strony rzeki (od strony miasta) prowadzone były roboty budowlane przy moście w okresie wiosennym i letnim, z drugiej strony natomiast znajdują się użytki zielone o podłożu murszowym. Kilkadziesiąt metrów wcześniej, rzeka płynie pośród lasu łęgowego. W pobliżu stanowiska 3, przebiega droga o średnim natężeniu ruchu. Stanowisko poboru nr 3 obrazuje zdjęcie na Rysunku 5.



Rysunek 5. Stanowisko nr 3 w okresie jesiennym

Źródło: Opracowanie własne

2.4. Metodyka badań mikrobiologicznych

W okresie wiosennym, badania mikrobiologiczne obejmowały wyznaczanie ilości bakterii grupy *coli* typu ogólnego i typu termotolerancyjnego, paciorkowców kałowych, a w okresie letnim i jesiennym oznaczano także ogólną liczbę bakterii w 26°C. Całość sprowadzała się do wyznaczania najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii (NPL), a także miana, zarówno bakterii grupy *coli* jak i paciorkowców kałowych. Oznaczenia wykonywano zgodnie z Polskimi Normami [5, 6]. W zależności od okresu, w którym wykonywane były badania, zmieniano ilość rozcieńczeń prób.

Oznaczanie bakterii grupy *coli* prowadzono metodą fermentacyjną próbowkową systemem dwupróbowkowym, wykorzystując zdolność tych bakterii do fermentacji laktozy, z wytworzeniem produktów kwaśnych

i gazowych. Zarówno do wykrywania bakterii grupy *coli* typu ogólnego jak i termotolerancyjnego, zastosowano gotowe podłoże Eijkmana firmy BIOCORP (Eijkman Lactose Medium). O dodatnim wyniku badania świadczyła zmiana barwy z fioletowej na żółtą, zmętnienie podłoża i gaz w rurce Durhama. Hodowlę paciorkowców kałowych prowadzono metodą probówkową systemem trójpróbówkowym. Pożywki zawierały w swoim składzie m.in. azydek sodowy oraz purpurę bromokrezolową. Zmętnienie podłoża, a także zmiana zabarwienia na kolor żółty świadczyły o wyniku dodatnim. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii w wodach prowadzono metodą posiewu powierzchniowego na płytkach agarowych. Korzystano z gotowego podłoża firmy BIOCORP (Wzbogacony LAB - AGARTM). Płytki inkubowano w temperaturze 26°C przez 48 godzin, co pozwoliło na jednoczesne wykrycie bakterii psychrofilnych i mezofilnych, gdyż oba typy bakterii mogą w podanej temperaturze wzrastać.

3. Wyniki badań i dyskusja

Po przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych wody i obliczeniach, zarówno wartości NPL i miana bakterii grupy *coli*, paciorkowców kałowych, a także określeniu ogólnej liczby bakterii w wodach na poszczególnych stanowiskach, dokonano szczegółowej analizy uzyskanych wyników. Wskazano prawdopodobne przyczyny, które mogły mieć wpływ na otrzymane wartości oraz źródła ich potencjalnego pochodzenia. Niekiedy problematyczne było sprecyzowanie przyczyn uzyskanych wyników, ponieważ często na nie składać się mogło wiele różnych czynników, zarówno pochodzenia antropogenicznego, jak i naturalnego.

Tabela 1. przedstawia wyniki oznaczania bakterii grupy *coli* typu ogólnego z całego okresu badawczego.

Tabela 1. Zestawienie wyników oznaczania bakterii grupy *coli* typu ogólnego

Nr stanowiska	Bakterie grupy <i>coli</i> typu ogólnego					
	NPL w 100 cm ³			Miano		
	WIOSNA	LATO	JESIEŃ	WIOSNA	LATO	JESIEŃ
1	620	6200	2300	0,2	0,02	0,04
2	7000	6200	620	0,01	0,02	0,2
3	1300	2300	6200	0,08	0,04	0,02
Średnia	2973	4900	3040	0,1	0,03	0,09

Źródło: Opracowanie własne

Porównując otrzymane wyniki można stwierdzić, że charakteryzują się one dość dużym rozrzutem. W zależności od pory roku, ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego znacznie wahała się.

Na stanowisku pierwszym, NPL bakterii w 100 cm³ badanej wody kształtuje się na poziomie od 620 (wiosną) do 6200 (latem). Prawdopodobną przyczyną uzyskania rozbieżności w wynikach może być fakt, iż sposób wykorzystywania terenu wokół stanowiska zmieniał się w zależności od pory roku. Wiosną, nie był prowadzony wypas bydła na przylegającej do cieków łące, a poziom wód w rzece był najwyższy spośród wszystkich stanowisk w całym okresie badawczym, stąd też, ilość bakterii *coli* okazała się być najniższa. Latem zaś, prowadzono intensywny wypas bydła, a ze względu na niski stan wód w rzece z racji wysokich temperatur, zwierzęta te, miały swobodny dostęp do cieków, co zaobserwowano podczas pobierania prób. Przedostające się do wód odchody zwierzęce, zarówno ze spływem, jak i bezpośrednio, mogły więc powodować większą ilość bakterii grupy *coli* wykrywaną w wodzie. Jesienią, nie zauważono na pobliskim terenie pasących się zwierząt,

a niższe temperatury mogły się przyczynić do obniżenia ilości tych bakterii.

Na stanowisku drugim, zlokalizowanym za zbiornikiem retencyjnym, największa ilość bakterii *coli* typu ogólnego wykryta została wiosną. Jest to też najwyższy wynik z całego okresu badawczego (NPL w 100 cm³ wyniosło 7000). Trudno jest ocenić, czy tak wysoka wartość NPL była spowodowana przypadkowym, miejscowym zanieczyszczeniem pochodzenia kałowego, czy też inne czynniki wpływały na osiągnięty wynik. Niemniej jednak, może mieć to związek z obserwowanym, silnym zanieczyszczeniem dna rzeki oraz toni wodnej, w której niesione były różnego pochodzenia substancje zawieszone, widoczne gołym okiem. W okresie letnim, obserwowano nieznacznie niższą ilość bakterii grupy *coli*, jesienią natomiast, ilość tych bakterii na stanowisku drugim wielokrotnie spadła. Bardzo niski poziom wody, brak kontaktu ze zbiornikiem retencyjnym (z racji zamkniętych rurociągów) oraz występujący kilkustopniowy mróz, mogły przyczynić się do redukcji tych mikroorganizmów.

Na stanowisku trzecim, zlokalizowanym ok. 0,5 km dalej od kąpieliska, obserwowano stopniowy wzrost ilości bakterii pochodzenia jelitowego na przestrzeni trzech pór roku. Wiosną, bakterii tego typu stwierdzano najmniej (NPL w 100 cm³ wynosiło 1300), latem było już ich prawie dwukrotnie więcej. W przypadku wiosny i lata, zauważano znacznie niższe ilości bakterii grupy *coli* w porównaniu do stanowiska położonego zaraz za zbiornikiem retencyjnym. Na uwagę zasługuje wysoka ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego w okresie jesiennym, która mimo niskiej temperatury wynosiła 6200 w 100 cm³ wody. Można przypuszczać, że wystąpiło tu punktowe zanieczyszczenie wody, np. spowodowane zrzutem nieoczyszczonych ścieków z domostw lub

spływem powierzchniowym z obszarów zurbanizowanych, z racji bliskiej odległości od nich. Średnia ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego na badanym fragmencie rzeki wynosiła 2973 wiosną, 4900 latem i 3040 jesienią w 100 cm³ badanej wody ze stanowisk.

Na podobnym do niniejszego opracowania obszarze, swoje badania prowadziły również Kukuła i Woszczyńska [7]. Rozpatrywały one stan czystości cieku zasilającego zalew i kąpielisko w Janowie Lubelskim, jednakże wpływ wód z kąpieliska na dalsze odcinki rzeki nie był określany. Stanowiska na cieku zasilającym kąpielisko były usytuowane w obrębie łąk i terenów zurbanizowanych. Miejscami w korycie rzecznym występowała liczna roślinność wodna. Badania obejmowały oznaczanie w wodzie bakterii grupy *coli* typu ogólnego i kałowego (termotolerancyjnego), paciorkowców kałowych i bakterii mezofilnych. Jedną z funkcji zbiornika w Janowie Lubelskim jest funkcja rekreacyjna, tak jak i zbiornika w Michałowie. Badania Kukuły i Woszczyńskiej [7] wykazały, że woda pobierana z kąpieliska okazała się być lepszej jakości niż woda zasilającego go cieku, w szczególności pod względem występowania bakterii grupy *coli* typu ogólnego, których w kąpielisku było zdecydowanie mniej niż w zasilającej rzece. Przypuszczalnie, jest to związane z rozcieńczaniem wody rzecznej wodami większego zbiornika. W nawiązaniu do przytoczonych informacji, wody kąpieliska zatem powinny być czystsze i powinny wprowadzać do odbiornika wody o lepszej jakości, przez co ilość mikroorganizmów powinna być w pewnym stopniu zredukowana. Porównując wyniki badań na stanowiskach nr 1 i 2 wiosną stwierdzono, że ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego za kąpieliskiem znacząco wzrosła, a latem zarówno przed zbiornikiem jak i za utrzymywała się na takim samym poziomie, równym 6200 w 100 cm³ wody.

Przeprowadzone badania stanu sanitarnego Supraśli w obrębie kąpieliska w Michałowie, mogą więc świadczyć, że w kąpielisku w okresie wiosenno-letnim występowało duże zanieczyszczenie bakteriami grupy *coli* typu ogólnego, co mogło stwarzać zagrożenie dla kąpiących się tam osób. Ciek na stanowisku drugim mógł być również zanieczyszczony na kilkudziesięciometrowym odcinku pomiędzy zalewem a drugim stanowiskiem, z którego pobierana była woda.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia [8], wody na stanowisku pierwszym i trzecim zaklasyfikowano pod względem zawartości bakterii grupy *coli* typu ogólnego głównie do kategorii A2, a na stanowisku drugim do kategorii A3.

Tabela 2. przedstawia wyniki oznaczania bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego z całego okresu badawczego.

Tabela 2. Zestawienie wyników oznaczania bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego

Nr stanowiska	Bakterie grupy <i>coli</i> typu termotolerancyjnego					
	NPL w 100 cm ³			Miano		
	WIOSNA	LATO	JESIEŃ	WIOSNA	LATO	JESIEŃ
1	620	6200	230	0,2	0,02	0,4
2	2400	620	620	0,04	0,2	0,2
3	1300	2300	6200	0,08	0,04	0,02
Średnia	1440	3040	2350	0,11	0,09	0,21

Źródło: Opracowanie własne

W przypadku bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego, również zaobserwowano wahania uzyskanych wyników. Osiągnięte

wielkości są jednak niższe lub takie same w porównaniu z bakteriami grupy *coli* typu ogólnego. Jednakowa ilość bakterii obu typów świadczy o tym, iż wszystkie są one aktywne również w wyższej temperaturze. W 67% badanych prób stwierdzano jednakowe ilości bakterii grupy *coli* typu ogólnego i typu termotolerancyjnego. Pochodzenie termotolerancyjnych pałeczek *E.coli* jest bardzo zbliżone do wcześniej omawianych pałeczek *E.coli* typu ogólnego. W szczególności są to odchody pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego, ścieki z okolicznych domostw czy gleba.

Na stanowisku pierwszym, tylko w okresie jesiennym nastąpiły zmiany ilości bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego w stosunku do bakterii grupy *coli* typu ogólnego i było ich wielokrotnie mniej. Zanieczyszczenie tymi bakteriami mogło pochodzić np. ze spływów wraz z glebą.

Na stanowisku drugim, wiosną i latem liczba bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego w 100 cm³ wody wynosiła odpowiednio: 2400, czyli prawie trzykrotnie mniej i 620, czyli dziesięciokrotnie mniej w porównaniu do liczby bakterii grupy *coli* typu ogólnego. Z tego wynika, że stanowisko to charakteryzuje się najmniejszą ilością bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego, a wykryte bakterie za zbiornikiem retencyjnym mogły pochodzić nie tylko ze skażenia kałem, ale również ze spływów powierzchniowych, czy podłoża glebowego (torfy, mursze).

Wszystkie pozostałe wyniki badania wód, w których liczba bakterii grupy *coli* obu typów była jednakowa, mogły świadczyć o ich bezpośrednim kontakcie z fekaliami lub ściekami, w szczególności wynik otrzymany jesienią na stanowisku trzecim. Bliskość obszaru zurbanizowanego mogła powodować przedostawanie się zanieczyszczeń typu kałowego. Bakterie grupy *coli* typu termotolerancyjnego stanowiły:

26% (stanowisko drugie), 77% (stanowisko pierwsze) i 100% (stanowisko trzecie) wszystkich wykrytych bakterii grupy *coli* (średnia na danym stanowisku z trzech pór roku). Tak duży stosunek bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego do bakterii grupy *coli* typu ogólnego, może świadczyć o dużym zanieczyszczeniu kałowym w obrębie badanego fragmentu cieku. Średnia ilość bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego na badanym odcinku Supraśli wynosiła 1440 wiosną, 3040 latem i 2350 jesienią w 100 cm³ badanej wody ze stanowisk.

Bakterie grupy *coli* typu termotolerancyjnego w badaniach prowadzonych przez Kukułę i Woszczyńską [7] w cieku zasilającym kąpielisko w Janowie Lubelskim, stanowiły średnio od 3 do 25% wszystkich wykrytych bakterii grupy *coli* na poszczególnych stanowiskach. Są to wielkości zdecydowanie niższe w porównaniu do uzyskanych wyników w niniejszym opracowaniu.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. [8], wodę na stanowisku pierwszym i drugim zaklasyfikowano pod względem zawartości bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego głównie do kategorii A2, a na stanowisku trzecim głównie do kategorii A3.

Dodatkowo, badane wody oceniono też pod kątem ich przydatności na cele kąpieliskowe, z racji, iż ciek ten połączony jest z kąpieliskiem, a więc powinien spełniać podobne wymagania. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 8 kwietnia 2011 r. w sprawie prowadzenia nadzoru nad jakością wody w kąpielisku i miejscu wykorzystywanym do kąpiei [9], w ocenie bieżącej jakości wody wykazano, że w okresie wiosennym woda ze stanowiska pierwszego zasilająca zbiornik spełniała aktualne normy pod względem zawartości

bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego. Latem, ilość kałowych bakterii grupy *coli* ponad sześciokrotnie przewyższyła wartości dopuszczalne. Jesienią, po zakończonym sezonie kąpielowym i zamknięciu rurociągu łączącego ciek ze zbiornikiem, ilość bakterii znacząco zmalała i woda znów spełniała normy.

W Tabeli 3. zaprezentowano wyniki oznaczania paciorkowców kałowych w badanych próbach wody.

Tabela 3. Zestawienie wyników oznaczania paciorkowców kałowych z całego okresu badawczego

Nr stanowiska	Paciorkowce kałowe					
	NPL w 100 cm ³			Miano		
	WIOSNA	LATO	JESIEŃ	WIOSNA	LATO	JESIEŃ
1	23	43	9	4	2	11
2	23	43	23	4	2	4
3	43	23	39	2	4	3
Średnia	30	36	24	3,3	2,7	6

Źródło: Opracowanie własne

W przypadku paciorkowców kałowych, ich ilość jest zdecydowanie mniejsza od ilości bakterii grupy *coli*, a rozrzut wyników niewielki. Większość wartości NPL w 100 cm³ wody zawiera się w przedziale od 23 do 43. Paciorkowce kałowe są wskaźnikami świeżego, kałowego zanieczyszczenia wód [10].

Na stanowisku pierwszym w okresie jesiennym odnotowano najniższą liczbę paciorkowców kałowych, wynoszącą 9 w 100 cm³ wody, co tłumaczyć można brakiem prowadzenia wypasu zwierząt na przyległym obszarze oraz dość znaczną odległością od terenów mieszkalnych. Dodatkowo, niska temperatura otoczenia i samej wody nie sprzyjała rozwojowi tych bakterii, których wzrost następuje

w temperaturach od 7 do 45°C [11]. Wiosną, nie obserwowano wypasu bydła w obrębie stanowiska, jednakże paciorkowce mogły się przedostawać wraz ze spływem powierzchniowym z glebą, a wyższe temperatury sprzyjały ich rozwojowi. W okresie letnim, optymalna temperatura do wzrostu enterokoków, kontakt cieku z odchodami zwierzęcymi oraz zdecydowanie niższy stan wody, mogły być przyczyną wyższej ilości paciorkowców kałowych na omawianym stanowisku.

Na stanowisku drugim, wiosną i jesienią ilość enterokoków nie była znaczna (23 w 100 cm³ wody), a latem ich ilość była prawie dwukrotnie wyższa. Może to wynikać z trwającego wówczas sezonu kąpielowego, przez co woda w kąpielisku mogła być bardziej zanieczyszczona, np. zanieczyszczeniami pochodzenia ludzkiego bądź zwierzęcego, a w konsekwencji była odprowadzana do cieku. Paciorkowce kałowe mogły również pochodzić z zanieczyszczonych wód z poprzedniego stanowiska, gdzie prowadzony był wypas bydła.

Na stanowisku trzecim z kolei, obserwowano nieco wyższe ilości paciorkowców kałowych wiosną i jesienią, mniejsze latem, w porównaniu do pozostałych stanowisk. Jego lokalizacja, w pobliżu obszaru zurbanizowanego, mogła być przyczyną dopływu zanieczyszczeń do rzeki, w tym kałowych, np. w wyniku zrzutów ścieków czy nieszczelności szamb.

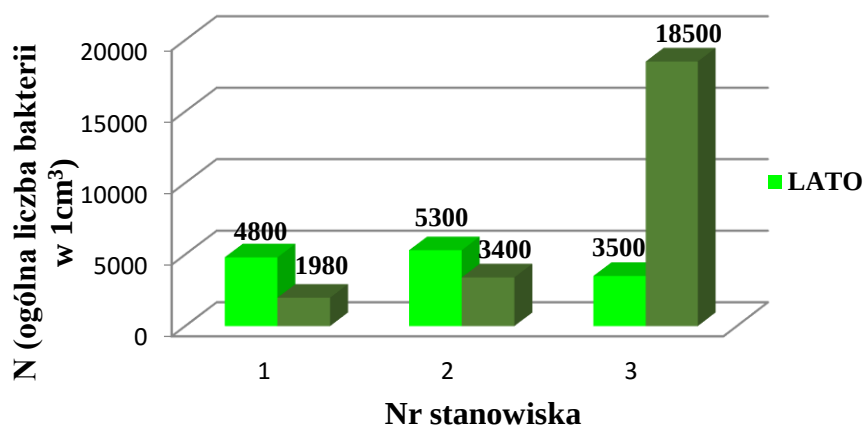
Porównując wyniki Kukuły i Woszczyńskiej [7] z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy, ilość paciorkowców kałowych w obrębie kąpieliska w Michałowie jest dużo niższa, nawet kilkukrotnie. Wspomniane wyżej przyczyny mogły wpływać na osiągnięte wyniki, jednak ich intensywność nie była duża.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. [8], wodę na wszystkich stanowiskach pod względem

występowania paciorkowców kałowych zaklasyfikowano do kategorii A2 (wartość dopuszczalna 1000 w 100 cm³), a na stanowisku pierwszym w okresie jesiennym do kategorii A1 (wartość dopuszczalna 20 w 100 cm³ próby). Uzyskane wyniki pokazują, że wody cieką są w bardzo małym stopniu skażone enterokokami.

Odwołując się do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 8 kwietnia 2011 r. [9], stwierdzono, że ilości enterokoków na wszystkich stanowiskach spełniały wymagania stawiane wodzie przeznaczonej na cele kąpieliskowe (wartość dopuszczalna ≤ 400 w 100 cm³ wody).

Na Rysunku 6. przedstawiono wyniki oznaczania w badanych wodach ogólnej liczby bakterii latem i jesienią.



Rysunek 6. Wyniki oznaczania ogólnej liczby bakterii w całym okresie badawczym

Źródło: Opracowanie własne

Ogólną liczbę bakterii wzrastających w 26°C reprezentują gatunki psychrofilne i mezofilne, gdyż jak wcześniej wspomniano, w tej temperaturze mogą wzrastać obie grupy organizmów. Latem, największą ilość bakterii wykryto na stanowisku drugim. Najwyższa wartość uzyskana jesienią na stanowisku trzecim, może wskazywać na pewne punktowe zanieczyszczenie spowodowane np. zrzutem nieoczyszczonych

ścieków. Pomimo niskiej temperatury w dniu poboru, wszystkie otrzymane wyniki badań z tego stanowiska (bakterii grupy *coli* i enterokoków) były podwyższone. W pozostałych przypadkach, obserwowano spadek ilości mikroorganizmów w okresie jesiennym, co w dużym stopniu mogło być uwarunkowane niską temperaturą. Porównując wyniki oznaczania ogólnej liczby bakterii z wynikami pozostałych badanych wskaźników, zauważono, że jest ich wielokrotnie więcej na każdym stanowisku, co jest zjawiskiem naturalnym, gdyż to w większości bakterie psychrofilne stanowią główną mikroflorę wody rzecznej. Mogą się przedostawać z różnych środowisk, zarówno w wyniku działalności człowieka, jak i procesów naturalnych, jak procesy mineralizacji materii organicznej, z powietrza, gleby czy odchodów zwierzęcych, stąd ogólna ilość bakterii jest znaczna, w szczególności w wodach powierzchniowych.

W Tabeli 4. przedstawiono średnie wyniki wszystkich oznaczanych wskaźników na poszczególnych stanowiskach w całym okresie badawczym.

Tabela 4. Średnie wyniki wszystkich wskaźników w całym okresie badawczym

Nr stanowiska	Średnia z całego okresu badawczego			
	NPL w 100 cm ³			jtk/cm ³
	Bakterie grupy <i>coli</i> (typ ogólny)	Bakterie grupy <i>coli</i> (typ termotolerancyjny)	Paciorkowce kałowe	Ogólna liczba bakterii
1	3040	2350	25	3390
2	4607	1213	30	4350
3	3267	3267	35	11000

Źródło: Opracowanie własne

Stwierdzono, że stanowisko nr 1 położone przed kąpieliskiem charakteryzowało się najmniejszą ilością bakterii grupy *coli* typu ogólnego, paciorkowców kałowych, ogólnej liczby bakterii oraz średnią ilością bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego w stosunku do pozostałych stanowisk. Pomimo tego, otrzymane wielkości bakterii grupy *coli* zarówno typu ogólnego jak i termotolerancyjnego były znaczne, stąd też wody wprowadzane do kąpieliska mogły mieć negatywny wpływ na jego czystość sanitarną. Stanowisko nr 2 zlokalizowane za kąpieliskiem, wykazywało największą ilość bakterii grupy *coli* typu ogólnego, pozostałe wskaźniki kształtowały się na średnim poziomie w stosunku do pozostałych stanowisk. Jak wcześniej zauważono, zanieczyszczenia bakteriami grupy *coli* w okresie wiosenno-letnim mogły pochodzić z kąpieliska, pogarszając tym samym jakość wód w rzece Supraśl. Na stanowisku nr 3, oddalonym od zbiornika rekreacyjnego i położonym w bliskim sąsiedztwie terenu zurbanizowanego, stwierdzono występowanie największych ilości wszystkich oznaczanych bakterii, za wyjątkiem bakterii grupy *coli* typu ogólnego.

4. Wnioski

1. Stan sanitarny rzeki Supraśl w obrębie kąpieliska w Michałowie zmieniał się w zależności od pory roku. Ilość mikroorganizmów uznawanych za wskaźniki stanu sanitarnego, w przypadku bakterii grupy *coli* typu ogólnego i typu termotolerancyjnego dość znacznie wahała się w całym okresie badawczym (NPL bakterii grupy *coli* typu ogólnego od 620 do 7000 w 100 cm³ wody, bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego od 230 do 6200 w 100 cm³ wody), a w przypadku paciorkowców kałowych rozrzut wyników był niewielki (NPL od 9 do 43 w 100 cm³ wody). Wahania ogólnej liczby

bakterii wzrastających w 26°C nie były znaczne (od 1980 do 5300 jtk/cm³), za wyjątkiem jednego, wielokrotnie większego wyniku (18500 jtk/cm³).

2. Średnio, najwięcej bakterii w wodach badanego fragmentu rzeki Supraśl występowało latem, a wiosną i jesienią ich ilość była na podobnym poziomie. W wodach na stanowisku nr 1 usytuowanym przed kąpieliskim wykrywano najmniej mikroorganizmów wskaźnikowych, choć ich ilość była znaczna. Wody na stanowisku nr 2 (za zbiornikiem retencyjnym) charakteryzowały się największą ilością bakterii grupy *coli* typu ogólnego, a w wodach na stanowisku nr 3 występowało najwięcej bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego, paciorkowców kałowych oraz wszelkich bakterii, co świadczy, że wody te były najbardziej zanieczyszczone.
3. Występowanie bakteryjnych wskaźników stanu sanitarnego może świadczyć, że prawdopodobnie w wodzie znajdować się mogą także drobnoustroje chorobotwórcze, mogące wywoływać różnego rodzaju choroby skóry czy przewodu pokarmowego.
4. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia [8], oceniając tylko badane wskaźniki mikrobiologiczne, większość wód zaklasyfikowano do kategorii A2. W niektórych porach roku, wystąpiła również kategoria A1 (jeden wynik) i A3 (dwa wyniki).
5. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 8 kwietnia 2011 r. w sprawie prowadzenia nadzoru nad jakością wody w kąpielisku i miejscu wykorzystywanym do kąpieli [9], oceniając występowanie bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego (*Escherichia coli*)

i enterokoków w szczególności w wodach na stanowisku 1, wykazano, że wiosną i jesienią oba parametry były w normie. W okresie kąpielowym (letnim) wody nie spełniały obowiązujących norm pod względem zawartości bakterii grupy *coli* typu termotolerancyjnego.

6. Prawdopodobnych przyczyn uzyskanych wyników może być wiele. Niejednokrotnie na otrzymany wynik mogło wpływać wiele czynników, często nakładających się na siebie, o charakterze naturalnym bądź antropogenicznym. Najbardziej prawdopodobnym źródłem drobnoustrojów jelitowych są odchody zwierzęce zmywane z powierzchni terenu wraz ze spływem powierzchniowym, fekalia, mikroorganizmy pochodzące z gleby, z nieoczyszczonych ścieków i spływów z terenów zurbanizowanych. Czynniki naturalne, takie jak np. temperatura mogą również mieć wpływ na ilość mikroorganizmów.
7. Na stan czystości kąpieliska wody rzeczne wpływają negatywnie, szczególnie w sezonie kąpielowym, podczas którego ilość dostarczanych mikroorganizmów kałowych jest na wysokim poziomie. Dostawanie się dużych ilości zanieczyszczeń do zbiornika może ograniczać jego wykorzystanie np. do celów rekreacyjnych.
8. Kąpielisko w różnych okresach może też negatywnie wpływać na samą rzekę. Mogą w nim gromadzić się duże ilości zanieczyszczeń, a następnie być odprowadzane do wód rzecznych. Częste zakazy kąpieli w zbiorniku retencyjnym mogą być potwierdzeniem, że wody kąpieliska charakteryzują się złą jakością sanitarną.
9. Samooczyszczanie się rzeki może być utrudnione z uwagi na niski przepływ, niedużą ilość roślinności wodnej produkującej tlen, brak

mniejszych cieków wpadających do rzeki (które zazwyczaj niosą wody lepszej jakości) oraz przez ciągły napływ zanieczyszczeń z rolnictwa i terenów zurbanizowanych niesionych wraz z wodami Supraśli. Czynniki te powodują, że rzeka ma ograniczone możliwości oczyszczania się.

10. Jak wynika z badań, zasilająca kąpielisko rzeka Supraśl, niesie ze sobą duże ilości zanieczyszczeń kałowych. Zanieczyszczenia te trafiają do kąpieliska i mogą być niebezpieczne dla zdrowia kąpiących się tam osób, dlatego bardzo ważnym zadaniem jest dbałość o czystość tego ciek.
11. Rzeka Supraśl, mająca duże znaczenie dla gminy Michałowo, powinna być stale monitorowana i badana na przestrzeni każdej pory roku. Gmina powinna podejmować wszelkie możliwe działania, aby w takim ważnym cieku zasilającym kąpielisko, nie doprowadzać do pojawiania się dużej ilości zanieczyszczeń.
12. Zbiornik Małej Retencji Wodnej w Michałowie jest niedawno wybudowanym akwenem i jeśli ma być użyteczny dla mieszkańców, należy o niego dbać oraz monitorować jego otoczenie, by w razie pogorszenia jakości wody, w łatwy i szybki sposób wyeliminować źródło zanieczyszczenia.
13. Poprawa jakości wód w rzece polepszy jakość i czystość sanitarną kąpieliska. Mieszkańcy i turyści będą mogli bez obaw o swoje zdrowie zażywać kąpeli, a kąpielisko będzie dla nich dostępne przez cały rok. Skorzysta na tym i społeczeństwo i sama gmina.
14. Jednym z rozwiązań wpływających na poprawę jakości wody dopływającej do kąpieliska może być zastosowanie wstępnego, częściowego oczyszczania wód pochodzących ze spływów powierzchniowych. W tym celu, na drodze spływu wody celowe

byłoby zbudowanie płytkich zbiorników pełniących rolę biofiltrów, o głębokości 20-30 cm i porośniętych roślinnością [12]. Innym rozwiązaniem na ograniczenie przedostających się zanieczyszczeń może też być zastosowanie rowów opaskowych w obrębie zbiornika retencyjnego czy naturalnych barier w postaci ochronnych nasadzeń. W miarę możliwości, należy też rozszerzać zasięg sieci kanalizacyjnej, aby wyeliminować ewentualne wycieki z szamb.

Literatura:

1. <http://www.psse.bialystok.pl/oceny-stanu-sanitarnego-miasta-i-powiatu.html>, [dostęp: 02.10.2015r.].
2. <http://www.wios.bialystok.pl/pdf/suprasl2006.pdf>, [dostęp: 12.11.2015r.].
3. Poźniak M.: *Instrukcja gospodarowania wodą, obsługi, utrzymania i eksploatacji Zbiornika Małej Retencji Wodnej w Michałowie*. Białystok, Urząd Gminy Michałowo, 2008, str. 5-12.
4. <http://mapy.geoportal.gov.pl/imap/>, [dostęp: 17.11.2015 r.].
5. PN-C-04615-05: Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie bakterii grupy *coli* metodą fermentacyjną probówkową, 1975.
6. PN-C-04615-25: Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie paciorkowców kałowych metodą filtrów membranowych (FM) i metodą probówkową, 1982.
7. Kukuła E., Woszczyńska W.: *Stan sanitarny wód cieku zasilającego zalew i kąpielisko w Janowie Lubelskim*, [w:] *Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, z. 57, Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 2010, str. 73-83.

8. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia (Dz. U. z 2002 r., Nr 204, poz. 1728).
9. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 8 kwietnia 2011 r. w sprawie prowadzenia nadzoru nad jakością wody w kąpielisku i miejscu wykorzystywanym do kąpieli (Dz. U. z 2011 r., Nr 86, poz. 478).
10. Michałkiewicz M.: *Bakterie wskaźnikowe występujące w wodach*, Wodociągi-Kanalizacja, nr 6, 2006, str. 18-21.
11. Grabińska-Łoniewska A., Siński E.: *Mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze w ekosystemach wodnych i sieciach wodociągowych*. Wyd. Seidel-Przywecki, Warszawa, 2010, str. 15-29.
12. Mioduszewski W.: *Małe zbiorniki wodne*. IMUZ, Falenty, 2006, str. 50-51.

inż. Marta Troc¹⁾, dr inż. Barbara Błachno²⁾
Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii
ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok
¹⁾martuuska1993@wp.pl
²⁾ b.blachno@pb.edu.pl

Wpływ warunków przechowywania wybranych produktów spożywczych na ich stan higieniczno-sanitarny

The influence of storage conditions of some food products on their hygienic and sanitary state

Słowa kluczowe: *produkty spożywcze, stan sanitarny, mikrobiologia żywności, przechowywanie*

Keywords: *food products, sanitary condition, food microbiology, storage*

Streszczenie: Na produkty spożywcze oddziałuje wiele czynników zewnętrznych m.in. mikroorganizmy, tlen, kurz, światło. Przed oddziaływaniem tych czynników powinno chronić opakowanie. Celem pracy jest ocena wpływu warunków przechowywania wybranych produktów spożywczych na ich stan higieniczno-sanitarny. Do badań wybrano sześć produktów spożywczych: pestki dyni łuskane, nasiona słonecznika, suszoną żurawinę ciętą, rodzynki, migdały oraz orzechy nerkowca. Badano produkty opakowane przez producenta i kupione na wagę. W produktach tych określano obecność bakterii grupy coli, bakterii mezofilnych i psychrofilnych oraz grzybów. Badania miały służyć ocenie, czy opakowanie zabezpiecza żywność przed zanieczyszczeniami mikrobiologicznymi. W badanych produktach nieopakowanych częściej stwierdzano wyższą liczbę bakterii niż w produktach opakowanych. Produkty opakowane częściej charakteryzowały się wyższą liczbą grzybów niż produkty nieopakowane. Opakowanie nie gwarantuje pełnej czystości mikrobiologicznej produktu. Ważna jest jakość produktu w momencie pakowania. Zapakowany produkt niewłaściwej jakości np. o zbyt dużej wilgotności, może być bardziej zanieczyszczony grzybami niż produkt nieopakowany. Uzasadnione jest rozszerzenie badań mikrobiologicznych na inne

produkty spożywcze oraz rozszerzenie zakresu badań o inne wskaźniki mikrobiologiczne np. bakterie z rodzaju *Salmonella* czy *Staphylococcus*. Badania takie mogłyby pomóc w określeniu takich metod przechowywania produktów spożywczych, które gwarantowałyby najlepszą jakość mikrobiologiczną.

1. Wstęp

Żywność odgrywa pierwszoplanową rolę w życiu człowieka, dlatego warunki przechowywania produktów spożywczych są niezwykle ważne, ze względów higienicznych i zdrowotnych. Właściwe i zdrowe przechowywanie żywności powinno być związane z odpowiednim doбором miejsca przechowywania, odpowiednią temperaturą przechowywania oraz czasem przechowywania.

Na jakość przechowywanej żywności oddziałuje wiele czynników. Największy wpływ na psucie się produktów spożywczych ma działalność mikroorganizmów znajdujących się w żywności. Proces ten zależy też od takich czynników jak: dostęp powietrza, wilgotność, temperatura, dostęp światła, czas przechowywania, czystość pomieszczeń oraz obecność substancji konserwujących w żywności. Aby nie dopuścić do szybkiego zepsucia się produktów spożywczych stosuje się różne metody utrwalania żywności. Przy utrwalaniu żywności wykorzystuje się metody fizyczne, chemiczne i biotechnologiczne oraz łączenie tych metod. Do metod utrwalania żywności zaliczyć również należy odpowiednie opakowanie żywności. Najczęściej wybieranym sposobem opakowania żywności jest jej zapakowanie hermetyczne, które wykorzystuje zastąpienie w opakowaniu powietrza przez gazy obojętne chemicznie.

1.1. Opakowania produktów spożywczych i ich funkcje

W celu zachowania jakości produktu podczas magazynowania, transportu i sprzedaży należy stosować opakowania dostosowane do właściwości produktu, jak również spełniające wymagania sanitarne i handlowe. W polskim prawie wymagania te określają: ustawa z 11 maja 2001r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia, ustawa z dnia 6 września 2001r. o materiałach i wyrobach przeznaczonych do kontaktu z żywnością oraz Rozporządzenie Ministra Zdrowia RP z 2004 r. i z 2005r. [1].

Na produkty spożywcze oddziałuje wiele czynników zewnętrznych, m.in. mikroorganizmy, tlen, kurz, światło. Przed oddziaływaniem tych czynników na produkt powinno chronić opakowanie. Opakowanie powinno także chronić przed wchłanianiem i utratą wilgoci, obcymi zapachami oraz przedostawaniem się innych zanieczyszczeń powodowanych przez szkodniki, takie jak insekty czy gryzonie. Użycie opakowań pozwala na bezpieczny i higieniczny transport i magazynowanie oraz ułatwia sprzedaż produktu. Nowoczesne materiały poprawiają właściwości techniczne opakowań. Przykładem takiego materiału jest folia metalizowana. Napylenie cząstek metalu na folię podwyższa właściwości ochronne opakowania oraz nadaje jej wysoki połysk. Opakowanie pełni także funkcję nośnika informacji o produkcie, sposobie przechowywania i użytkowania. Opakowanie powinno być wytrzymałe mechanicznie, a po wykorzystaniu nie powinno stanowić zagrożenia dla środowiska naturalnego. Istnieją uregulowania prawne zobowiązujące producentów do odzysku i recyklingu odpadów opakowaniowych, według ustalonych wskaźników procentowych [1].

1.1.1. Materiały opakowaniowe

Do produkcji opakowań wykorzystywane są materiały takie jak drewno, tkaniny naturalne lub sztuczne, papier, szkło, metal lub różne tworzywa sztuczne. Nie ma materiału uniwersalnego, który nadawałby się do pakowania wszystkich produktów. Każdy materiał opakowaniowy ma swoje cechy, które umożliwiają dobór w zależności od właściwości, jakimi charakteryzuje się dany produkt. Warunkiem dopuszczenia materiału opakowaniowego do kontaktu z produktem spożywczym jest uzyskanie pozytywnego atestu sanitarnego, zwanego inaczej certyfikatem bezpieczeństwa zdrowotnego. Certyfikat wydaje uprawniona do tego jednostka badawcza. Opakowania, które dostały atest muszą być znakowane symbolem graficznym, który przedstawia poniższy rysunek 1 lub powinny być oznaczone odpowiednim napisem [1].



Rysunek 1. Symbol opakowań mających atest sanitarny

Źródło: Ustawa z dnia 6 września 2001 r. o materiałach i wyrobach przeznaczonych do kontaktu z żywnością [2]

1.1.2. Barrierowość opakowań

Termin barierowość charakteryzuje przenikalność gazów, zapachów, aromatów i pary wodnej przez materiał opakowaniowy. Barrierowość zależy od właściwości materiału, jego grubości, szczelności

zamknięcia, temperatury, różnicy ciśnienia w opakowaniu i poza nim oraz od wilgotności pomieszczenia. Kiedy barierowość opakowania jest wysoka, wtedy wolniej zachodzi wymiana gazów i wilgoci między otoczeniem i zapakowanym produktem [1].

Wysoka barierowość opakowania może mieć pozytywną i negatywną stronę. Zależy to od właściwości pakowanego produktu. Wysoka barierowość opakowań dotyczy produktów silnie higroskopijnych, czyli podatnych na wchłanianie wilgoci lub nawet wiązanie się z wodą. Gdy produkt pakowany jest próżniowo, czyli w zmodyfikowanej atmosferze, to wtedy najważniejsza jest barierowość materiału opakowaniowego dla gazów będących składnikiem tej atmosfery. Najczęściej stosowanym gazem jest azot lub mieszanina kilku gazów. Dobór opakowania powinien być dostosowany do rodzaju użytego gazu wewnątrz opakowania, ponieważ przenikalność poszczególnych gazów przez opakowanie jest silnie zróżnicowana. Najbardziej zróżnicowanym materiałem opakowaniowym pod względem barierowości jest folia polietylenowa (PE), która posiada wysoką barierowość dla wilgoci, zaś bardzo niską dla gazów, szczególnie tlenu i dwutlenku węgla. Folia ta nie zabezpiecza produktu przed oddziaływaniem z zewnątrz tlenu i innych gazów. Zabezpiecza ona produkt jedynie przed wysychaniem i absorpcją wilgoci z otoczenia [1].

1.2. Źródła drobnoustrojów w żywności

Podatność żywności na rozwój bakterii wiąże się z odpowiednią zawartością substancji odżywczych, wody, a także odpowiednią wartością pH. Bakterie rozmnażają się przez prosty podział, który w korzystnych warunkach środowiska następuje co 20 minut. Prowadzi to do szybkiego nagromadzenia bakterii w danym środowisku.

Niekontrolowany rozwój bakterii prowadzi do niekorzystnych zmian organoleptycznych produktów, obniżenia ich trwałości, co z kolei prowadzi do dużych strat ekonomicznych [3].

Produkty żywnościowe z reguły zawierają drożdże, pleśnie oraz żywe komórki bakterii i stwarzają dobre środowisko do ich rozwoju. Większość z tych drobnoustrojów jest niepożądana, ponieważ ich rozwój może prowadzić do psucia się żywności czy nawet może być przyczyną zatrucia pokarmowych. Aby temu zapobiegać, zahamowuje się rozwój mikroorganizmów, redukuje ich liczbę czy też całkowicie wyeliminowuje się je z produktu już w procesie produkcji i przechowywania żywności [4].

Drobnoustrojami powszechnie zanieczyszczającymi środowisko roślinne są mikroorganizmy glebowe z rodzaju *Clostridium*, tlenowce przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus*, tlenowce nieprzetrwalnikujące, promieniowce oraz grzyby. Wśród tych mikroorganizmów znajduje się także mikroflora jelitowa, z najbardziej charakterystycznymi bakteriami grupy *coli* [5].

Drobnoustroje dostają się do żywności ze źródeł zewnętrznych, czyli obcych. Powietrze jest jednym z zewnętrznych źródeł drobnoustrojów. Drobnoustroje w powietrzu obecne są w kropelkach wody oraz w drobinach kurzu. Powietrze nie jest środowiskiem, w którym drobnoustroje mogą się rozwijać, ale mogą się w nim znajdować i być przenoszone wraz z prądami powietrza. Skład ilościowy mikroorganizmów w powietrzu zależy od wilgotności, temperatury, stopnia zanieczyszczenia cząstkami stałymi, odporności drobnoustrojów na działanie promieniowania UV oraz wysuszenia. W powietrzu suchym, o niskiej zawartości drobin kurzu i dość wysokiej temperaturze liczebność mikroflory jest najmniejsza. Powietrze może stać się ośrodkiem

przenoszenia wirusów i bakterii chorobotwórczych, jeśli w jego otoczeniu są obecne źródła patogenów. Takim źródłem może być człowiek będący nosicielem zarazków czy też farmy drobiowe. Aby zminimalizować zakażenie żywności drobnoustrojami z powietrza należy usunąć potencjalne źródła drobnoustrojów, obniżać wilgotność powietrza, oczyszczać powietrze na drodze filtracji czy też wyjaławiać promieniowaniem UV [4].

Kolejnym zewnętrznym źródłem drobnoustrojów jest gleba, która jest najbogatszym środowiskiem pod względem mikroorganizmów na naszej planecie. Drobnoustroje mogą rozmnażać się w glebie, dlatego ich liczba może osiągać nawet kilka miliardów komórek na 1 g suchej substancji. Do żywności mogą dostawać się gleby bakterie należące do rodzajów: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, a także drożdże i pleśnie. Gleba, która zanieczyszczona jest fekaliami może być źródłem wirusów i jelitowych patogenów [4].

Woda jest kolejnym źródłem drobnoustrojów w żywności. Jest to naturalne środowisko bytowania mikroorganizmów. Bakterie przeważające w wodzie są Gram-ujemne i psychrofilne. Są to autotrofy i heterotrofy. Najliczniejszymi autotrofami w wodzie są bakterie z rodzajów *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Gallionella*, zaś najliczniejszymi heterotrofami są gatunki z rodzaju *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Selenomonas*, *Spirillum*, *Spirochaeta*. W wodach powierzchniowych mogą okresowo występować mikroorganizmy pochodzące z powietrza, gleby i ścieków. Woda używana w zakładach przemysłu spożywczego musi odpowiadać warunkom wody do picia i celów gospodarczych [4].

Ścieki, używane do użytkowania upraw rolnych, czyli obornik i gnojowica, mogą powodować zanieczyszczenie żywności drobnoustrojami. Najbardziej niebezpieczne są enteropatogenne bakterie i wirusy. Ze ścieków do żywności mogą dostać się także pasożyty. Aby ograniczyć skażenie żywności drobnoustrojami, należy stosować nawozy naturalne po odpowiedniej obróbce zabijającej patogeny. Ważne jest także dokładne mycie owoców i warzyw po ich zbiorze [4].

1.3. Czynniki wpływające na mikrobiologiczne psucie się żywności

Najważniejsze czynniki wpływające na psucie się żywności to zawartość wody, skład chemiczny, kwasowość, temperatura, warunki gazowe, czas przechowywania a także materiał opakowaniowy [6].

Ze względu na zawartość wody produkty żywnościowe można podzielić na produkty z wysoką jej zawartością, o obniżonej zawartości wody, produkty suche oraz żywność głęboko zamrożoną. Im produkt zawiera więcej wody, tym bardziej podatny jest na zepsucie oraz więcej drobnoustrojów bierze w nim udział. Brak wody hamuje rozwój mikroorganizmów, dlatego jedną z popularnych metod przechowywania żywności jest jej suszenie. Woda jest także niedostępna w produktach mrożonych. Przed zepsuciem żywności chroni także dodatek soli czy cukru. Powoduje to wzrost ciśnienia osmotycznego i spadek aktywności wody. Takie warunki sprzyjają zahamowaniu rozwoju większości drobnoustrojów. Są jednak gatunki preferujące takie warunki. Należą do nich bakterie halofilne, które rozwijają się na produktach solonych, zawierających ponad 20% NaCl. Są to drobnoustroje osmofilne, głównie drożdże i pleśnie, które rozwijają się w warunkach wysokiego stężenia cukru i soli [7].

Temperatura jest kolejnym czynnikiem wpływającym na psucie się żywności. Produkty żywnościowe nie poddane sterylizacji stają się podatne na zepsucie w przedziale temperatur od -5°C do 70°C . Różne grupy mikroorganizmów są zdolne do wzrostu w innych zakresach temperatur. Pleśnie i drożdże, to psychrofile, czyli grupa organizmów rozwijająca się w temperaturze pokojowej lub niższej. To dlatego pleśnie i drożdże są główną przyczyną psucia się żywności przechowywanej w warunkach chłodniczych [7].

Według Gawędzkiego w mięsie zwierząt ciepłokrwistych dominują drobnoustroje mezofilne i one stanowią najważniejszą przyczynę jego psucia się. Psucie się mięsa przechowywanego w chłodniach powodują bakterie i pleśnie psychrofilne. Psucie się ryb spowodowane jest też głównie przez bakterie psychrofilne, ale mogą w nim uczestniczyć również bakterie mezofilne pochodzące z otaczającego środowiska. Za psucie się mleka są odpowiedzialne bakterie mezofilne, zwłaszcza jeśli mleko nie jest po udoju schłodzone. Jednak nawet mleko schłodzone może podlegać zepsuciu, którego przyczyną są bakterie psychrofilne, rozwijające się jednak znacznie wolniej [7].

Różne grupy mikroorganizmów rozwijają się w określonych dla nich zakresach pH środowiska. Najwięcej drobnoustrojów rozwija się przy pH obojętnym. Zazwyczaj w żywności o pH niższym niż 5 nie rozwijają się mikroorganizmy. Wyjątkiem są pleśnie i drożdże, które preferują środowisko kwaśne i odpowiadają za psucie się żywności zakwaszonej. Są też mikroorganizmy, które produkują kwasy, powodując zmianę zapachu oraz struktury produktu [7].

Potencjał redox i natlenienie produktu również wpływają na rodzaj drobnoustrojów, powodujących psucie się żywności. Psucie się

żywności spowodowane przez organizmy tlenowe powoduje zmiany na powierzchni produktu. Zmiany na produkcie, jak i wewnątrz niego powodują względne beztlenowce [7].

Na psucie się żywności ma także wpływ jej skład chemiczny. Produkty białkowe są atakowane głównie przez drobnoustroje proteolityczne z rodzajów: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*. Produkty zawierające węglowodany atakowane są przez organizmy o zdolnościach fermentacyjnych, zaś tłuszcze przez drobnoustroje zawierające enzymy lipolityczne [7].

1.4. Bezpieczeństwo żywnościowe

Bezpieczeństwo żywności jest to pewność, iż produkty żywnościowe, nie zawierają patogennych drobnoustrojów i ich toksycznych metabolitów. Bezpieczna żywność to taka, która nie zawiera patogennych wirusów, mykotoksyn wytwarzanych przez niektóre grzyby oraz pasożytów np. *Trichinellaspīralis*, *Lamblia*, *Cryptosporidiumparvum* [8].

Według Molendy do zatrucia pokarmowego dochodzi, gdy liczebność toksynogennych drobnoustrojów w produkcie osiągnie co najmniej 10^6 jtk/cm³ lub g [8].

Szybkie i precyzyjne określenie zagrożenia mikrobiologicznego pozwala na skuteczną profilaktykę i podejmowanie działań prozdrowotnych. Do metod oceny bezpieczeństwa zaliczyć należy zarówno jakościowe jak i ilościowe metody określenia ryzyka [9].

Do metod oraz narzędzi dostosowanych do oceny mikrobiologicznej w środowisku zalicza się prognozowanie mikrobiologiczne oraz MRA (MicrobialRiskAssessment) czyli ocenę zagrożenia mikrobiologicznego. MRA jest to podejście o podstawach

naukowych, służące do oceny prawdopodobieństwa narażenia i późniejszego wpływu czynnika chorobotwórczego na zdrowie ludzkie. Jest wiele powodów do podjęcia wdrożenia nadzorowania bezpieczeństwa żywności. Najważniejsze powody to powstanie oporności na wiele antybiotyków, spadek odporności organizmów ludzkich oraz mutacje mikroorganizmów. Metoda MRA polega na zidentyfikowaniu zagrożenia, dokładnym jego scharakteryzowaniu (określenie związku pomiędzy ilością czynnika chorobotwórczego a częstotliwością wywoływania reakcji chorobowej organizmu), oszacowaniu stopnia narażenia na czynniki chorobotwórcze oraz ocenie ryzyka [9].

2. Metodyka badań

Do badań mikrobiologicznych wybrano sześć produktów spożywczych: pestki dyni łuskane, nasiona słonecznika, suszoną żurawinę ciętą, rodzynki, migdały oraz orzechy nerkowca. Badano produkty opakowane przez producenta i nieopakowane (na wagę). Produkty zostały zakupione w hipermarkecie Auchan Polska Sp. z o. o. w Białymstoku przy ulicy Produkcyjnej. Opakowania badanych produktów stanowiły torebki plastikowe. W wybranych produktach oznaczano ogólną liczbę bakterii psychro- i mezofilnych, liczbę grzybów oraz liczebność bakterii grupy coli.

2.1. Przygotowanie próbek do badań

Do kolby zawierającej 90cm³ jałowego 0,85% roztworu NaCl dodano 10g badanego produktu spożywczego. Zawartość kolby wytrząsano na wytrząsarce przez 20 minut, po czym wykonano kolejne dziesięciokrotne rozcieńczenia każdej próby w zakresie 10⁻¹-10⁻².

2.2. Oznaczanie bakterii grupy *coli*

Liczebność bakterii grupy *coli* oznaczano metodą fermentacyjną probówkową [10]. Na podstawie ilości wyników dodatnich (zmętnienie podłoża, zmiana barwy z fioletowej na żółtą, obecność gazu w rurce Durhama) z tablic Mac Crady’ego odczytano wartość wskaźnika *coli* (NPL) i miana *coli*.

2.3. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii psychrofilnych i mezofilnych

Liczebność bakterii psychro- i mezofilnych wyznaczono metodą posiewu powierzchniowego na płytkach z agarem odżywczym [11].

Ostateczną liczbę bakterii w 1 g badanego produktu spożywczego wyznaczono korzystając ze wzoru:

$$N = A \times 10 / R \text{ [jtk/1g]} \quad (1)$$

gdzie:

N - liczba bakterii w 1 g badanej próbki gleby,

A - liczba kolonii wyrosłych na płytce,

R - rozcieńczenie próbki użyte do posiewu na danej płytce [12].

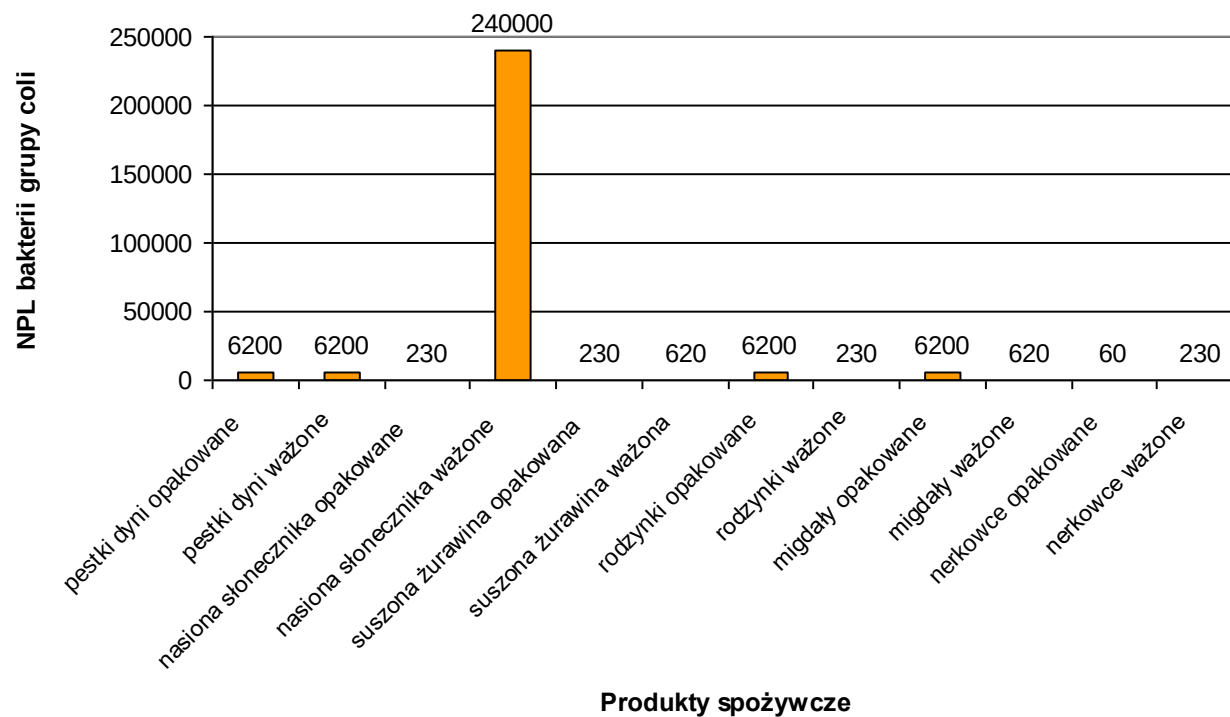
2.4. Oznaczanie ogólnej liczby grzybów

Oznaczenia ogólnej liczby grzybów (drożdży i pleśni) dokonano metodą posiewu powierzchniowego na płytkach agarowych z chloramfenikolem [13]. Ostateczną liczbę grzybów w 1 g badanego produktu spożywczego wyznaczono ze wzoru podanego w punkcie 2.3.

3. Wyniki badań i dyskusja

Otrzymane wyniki badań mikrobiologicznych przedstawiono na rysunkach 2 – 5.

Rysunek 2 przedstawia najbardziej prawdopodobną liczbę (NPL) bakterii grupy *coli* w badanych produktach spożywczych.

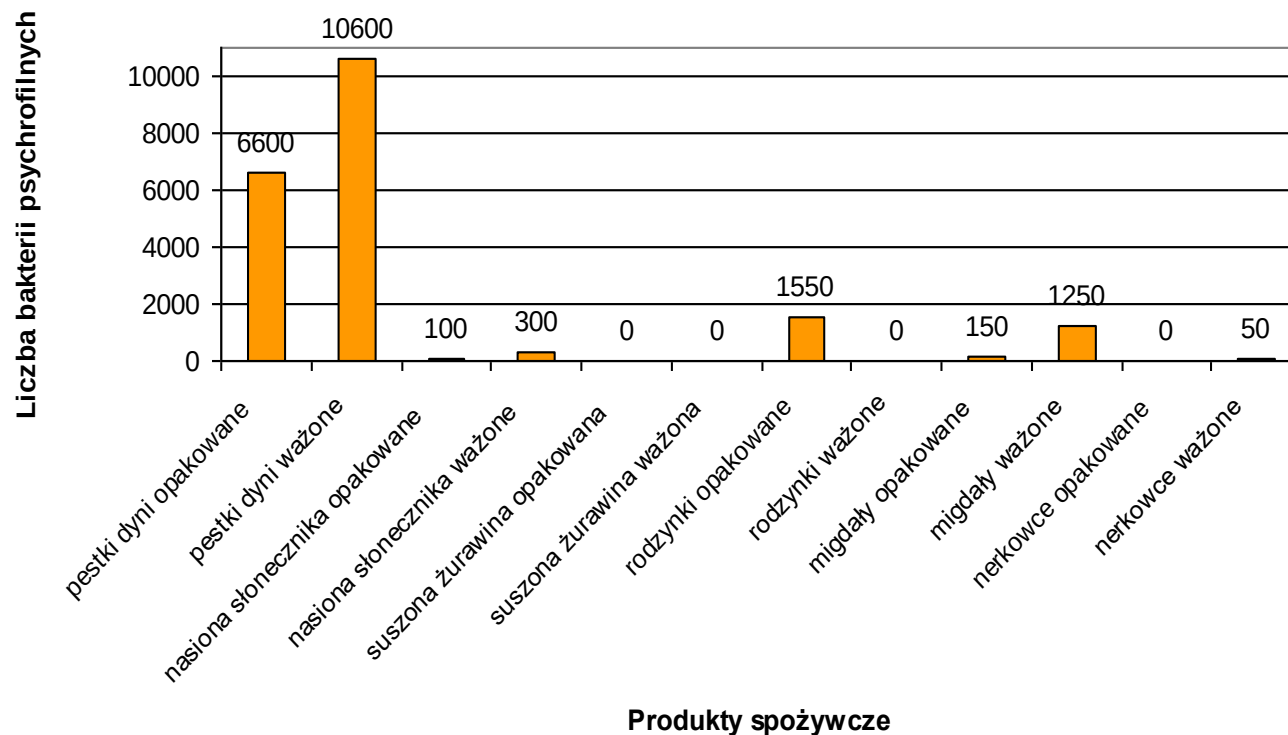


Rysunek 2. Liczebność bakterii grupy coli w badanych produktach spożywczych

Źródło: Opracowanie własne

Najbardziej prawdopodobna liczba (NPL) bakterii grupy *coli* w dwunastu przebadanych produktach spożywczych mieściła się w przedziale od 60 do 240000 na 100 g produktu. Najbardziej prawdopodobna liczba bakterii grupy *coli* była taka sama zarówno w opakowanych pestkach dyni jak i nieopakowanych. Biorąc pod uwagę nasiona słonecznika, bardziej zanieczyszczone bakteriami grupy *coli* okazały się nasiona nieopakowane. Liczba tych drobnoustrojów w nieopakowanych nasionach słonecznika przewyższała liczbę drobnoustrojów w nasionach opakowanych przez producenta ponad tysiąckrotnie. Suszona żurawina i nerkowce kupione „na wagę” to kolejne produkty, w których stwierdzono więcej bakterii grupy *coli* niż w wersji opakowanej tych produktów. Różnice te nie były jednak tak duże jak w przypadku nasion słonecznika. Z kolei rodzynki i migdały w opakowaniach charakteryzowały się większą ilością bakterii grupy *coli* niż te same produkty nieopakowane. Reasumując, częściej wyższe wartości wskaźnika *coli* stwierdzono w produktach nieopakowanych.

Rysunek 3 przedstawia liczbę bakterii psychrofilnych w badanych produktach spożywczych.

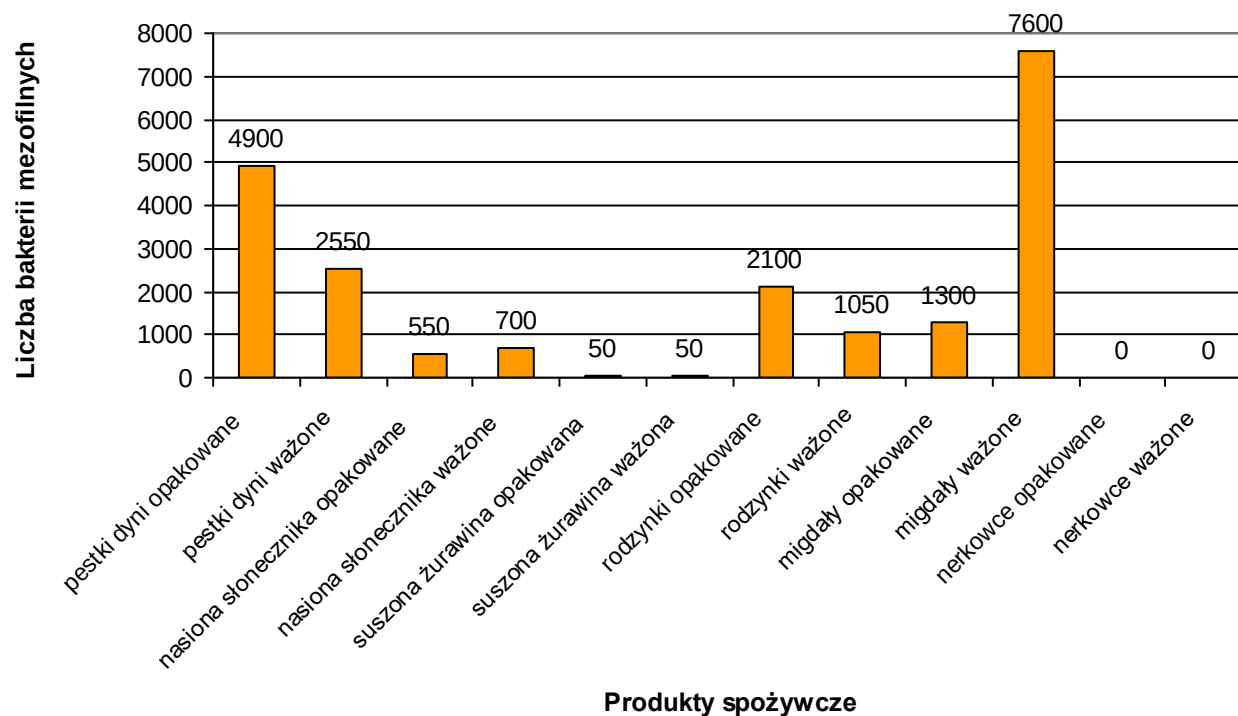


Rysunek 3. Liczebność bakterii psychrofilnych w badanych produktach spożywczych

Źródło: Opracowanie własne

Liczba bakterii psychrofilnych w przebadanych produktach spożywczych mieściła się w przedziale od 50 jtk/g do 10600 jtk/g. Wśród produktów nieopakowanych, które charakteryzowały się wyższymi wartościami liczby bakterii psychrofilnych są pestki dyni, nasiona słonecznika, migdały oraz nerkowce. Produktami opakowanymi, w których przeważała liczba bakterii psychrofilnych są rodzynki. Rodzynki ważone były całkowicie czyste pod względem zanieczyszczenia bakteriami psychrofilnymi. Bakterii tych nie stwierdzono również w suszonej żurawinie, zarówno opakowanej przez producenta, jak i nieopakowanej. W przypadku bakterii psychrofilnych, podobnie jak w przypadku bakterii grupy coli, bardziej zanieczyszczone okazały się produkty ważone (nieopakowane). Może to być związane z większym narażeniem produktów nieopakowanych na zanieczyszczenie bakteriami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego np. z powietrza, organizmu człowieka itp.

Rysunek 4 obrazuje liczbę bakterii mezofilnych w badanych produktach spożywczych.



Rysunek 4. Liczebność bakterii mezofilnych w badanych produktach spożywczych

Źródło: Opracowanie własne

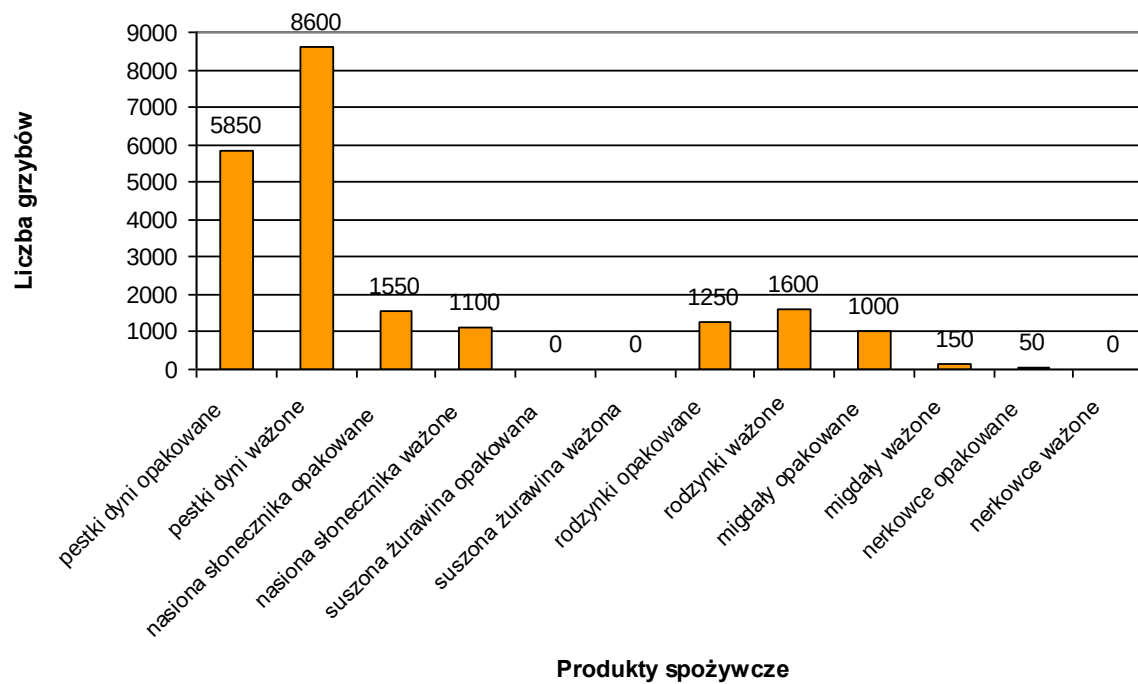
Liczba bakterii mezofilnych w przebadanych produktach spożywczych mieściła się w przedziale od 50 jtk/g do 7600 jtk/g. Produktami nieopakowanymi, w których stwierdzono większe ilości bakterii mezofilnych okazały się nasiona słonecznika oraz migdały. Były to jednak różnice minimalne (na poziomie tego samego rzędu wielkości). Produktami opakowanymi, w których przeważała liczba bakterii mezofilnych były pestki dyni i rodzyнки. Podobnie jak w przypadku produktów nieopakowanych były to różnice niewielkie. Liczba bakterii mezofilnych była taka sama w suszonej żurawinie opakowanej i nieopakowanej. Produktami czystymi pod względem zanieczyszczenia bakteriami mezofilnymi były nerkowce opakowane i „na wagę”. Biorąc pod uwagę zanieczyszczenie bakteriami mezofilnymi produktów spożywczych, można stwierdzić, że zanieczyszczenie produktów opakowanych przez producenta jak i nieopakowanych jest podobne. Można to uzasadnić faktem, iż bakterie mezofilne z reguły występują w środowisku zewnętrznym w mniejszych ilościach niż bakterie psychrofilne, toteż ich wpływ na żywność przechowywaną w różnych warunkach jest mniejszy niż bakterii psychrofilnych.

Jednym z badań, mającym na celu ocenę wpływu sposobu pakowania na jakość mikrobiologiczną produktu spożywczego jest praca Kordowskiej-Wiater. Badaniami objęto pasztety w różnego rodzaju opakowaniach oraz bez trwałego opakowania. Pasztety w puszkach i słoikach zawierały najmniej liczne populacje mezofili (do 0,3 jtk/g), zaś najwięcej było ich w pasztetach pakowanych próżniowo (0,45 - 0,55 jtk/g.) Wysokie wartości odnotowano także w pasztetach bez trwałego opakowania (do 0,52 jtk/g). Podobne wyniki odnotowano także w odniesieniu do bakterii psychrofilnych. Drożdże występowały w dwóch pasztetach pakowanych próżniowo w folie PE/PA, jednym

pakowanym w pojemnik aluminiowo-polipropylenowy oraz jednym pakowanym w słoik, zaś wzrostu pleśni nie odnotowano. Stwierdzono, iż najbardziej zanieczyszczonymi pasztetami okazały się te pakowane próżniowo w folie PE/PA oraz pasztety bez trwałego opakowania, czyli zakupione z lady chłodniczej. Najmniejszą liczbą mikroorganizmów charakteryzowały się pasztety pakowane w puszki [14].

Badaniem zanieczyszczeń mikrobiologicznych produktów spożywczych zajmowała się również Wójcik-Stopczyńska, która analizowała mieszanki musli pochodzące z sieci handlowej. Podstawowymi składnikami mieszanki musli były płatki zbożowe, suszone owoce oraz orzechy. Badania te wykazały, że w mieszankach musli ogólna liczba bakterii mezofilnych była zróżnicowana w przedziale 35-53000 jtk/g. W większości ocenianych prób liczba bakterii nie przekraczała 1000 jtk/g. Tylko w pojedynczych próbkach wyniki były wyższe od 10000 jtk/g [15].

Na rysunku 5 przedstawiono liczebność grzybów w wybranych produktach spożywczych.



Rysunek 5 Liczebność grzybów w badanych produktach spożywczych

Źródło: Opracowanie własne

W zanieczyszczonych próbkach żywności opakowanej grzyby występowały w liczbie od 50 jtk/g do 5850 jtk/g, a w żywności „na wagę” od 150 jtk/g do 8600 jtk/g. W badaniach Wójcik-Stopczyńskiej zanieczyszczenie musli drożdżami wynosiło do 303 jtk/g [15].

Według Steinki ocena mikroflory orzechów, migdałów, rodzynek, suszonych śliwek i moreli wskazuje na obecność *Bacillus* spp. w tych dodatkach. Orzechy, migdały i rodzynki stanowią źródło grzybów strzępkowych z rodzajów *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. Z orzechów i migdałów można natomiast wyizolować pałeczki jelitowe należące do rodzajów *Citrobacter*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Edwardsiella*. Orzechy i susze owocowe to produkty o niskiej zawartości wody. Orzechy stanowią częste źródło grzybów strzępkowych i dobre podłoże syntezy mykotoksyn. Grzyby z rodzaju *Fusarium* sp. i *Aspergillus* sp. są najczęściej izolowane właśnie z orzechów. Wśród zanieczyszczeń mikrobiologicznych pojawiają się również *Penicillium* sp. i *Rhizopus* sp.. Nieprawidłowe przechowywanie migdałów stanowi przyczynę rozwoju wielogatunkowej populacji bakterii, do której należą m.in. *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Xantomonas* sp.. Nasiona roślin oleistych charakteryzuje obecność podobnej mikroflory, jaka występuje w orzechach. Jednakże w przypadku tych produktów dominującym gatunkiem jest *Aspergillus niger* [9].

Analizując wartości liczby grzybów, stwierdzono iż produktami nieopakowanymi, w których te wartości są wyższe były pestki dyni i rodzynki. Przewaga tych wartości nie jest duża i jest to różnica jednego rzędu wielkości. Produktami opakowanymi, w których przeważała liczba grzybów są nasiona słonecznika, migdały i nerkowce. Produktem czystym pod względem zanieczyszczenia grzybami okazała się suszona

żurawina, zarówno opakowana przez producenta jak i nieopakowana. Pod względem zanieczyszczenia grzybami bardziej zanieczyszczone okazały się produkty opakowane. Podobną tendencję zaobserwowano w badaniach Kordowskiej-Wiater [14].

Rozpatrując, dlaczego w produktach opakowanych przeważa liczebność grzybów, zaś w produktach nieopakowanych przeważa liczebność bakterii, można wziąć pod uwagę kilka czynników.

Opakowania chronią produkt spożywczy przed wchłanianiem i utratą wilgoci oraz przed wchłanianiem obcych zapachów. Im większa wilgotność powietrza w otoczeniu produktu, tym produkt jest bardziej podatny na zepsucie oraz więcej drobnoustrojów bierze w nim udział. Dla rozwoju grzybów korzystne są wilgotne warunki powietrza. Produkty przechowywane bez opakowań (do kupienia na wagę) są bardziej narażone na wysychanie, dlatego liczba grzybów w tych produktach jest mniejsza. Produkty spożywcze zapakowane w nieodpowiednich warunkach powietrza oraz w nieodpowiednie opakowanie są narażone na szybsze zepsucie się. Każdy materiał opakowaniowy ma swoje cechy, które umożliwiają dobór w zależności do właściwości jakimi charakteryzuje się dany produkt. Nie ma materiału, który nadawałby się do pakowania wszystkich produktów. Badania produktów spożywczych wskazują na większe zanieczyszczenie grzybami produktów opakowanych. Przyczyną tego może być fakt, iż w opakowaniach panowała wyższa wilgotność powietrza, co sprzyja rozwojowi grzybów.

Biorąc pod uwagę, iż w przeprowadzonych badaniach liczba bakterii zarówno typu *coli*, psychrofilnych jak i mezofilnych jest wyższa w produktach ważonych, można stwierdzić, iż produkty te były przechowywane w niewłaściwych warunkach. Do produktów tych mogły

przedostawać się drobnoustroje z powietrza oraz z powierzchni ludzkiego ciała. Produkty prawidłowo opakowane są chronione przed działaniem tych czynników. Jednakże nie wszystkie przebadane produkty opakowane były całkowicie pozbawione zanieczyszczenia bakteriami. Do zanieczyszczenia produktów opakowanych mogło dojść podczas produkcji, pakowania produktów czy też uszkodzenia opakowania np. podczas transportu lub magazynowania. Niestety opakowania przed ich napełnieniem nie zawsze przechodzą przez linie napełnienia, które są jałowe mikrobiologicznie. Powodem nieszczelnego opakowania może być także uszkodzenie mechaniczne opakowania w późniejszych etapach produkcji.

4. Wnioski

1. Poddane badaniom produkty, zarówno opakowane jak i nieopakowane, były zanieczyszczone mikrobiologicznie.
2. W badanych produktach nieopakowanych częściej stwierdzano wyższą liczbę bakterii niż w produktach opakowanych.
3. Przebadane produkty opakowane częściej charakteryzowały się wyższą liczbą grzybów niż produkty nieopakowane.
4. Badania dowiodły, że opakowanie nie gwarantuje pełnej czystości mikrobiologicznej produktu. Ważna jest jakość produktu w momencie pakowania. Zapakowany produkt niewłaściwej jakości np. o zbyt dużej wilgotności, może być bardziej zanieczyszczony grzybami niż produkt nieopakowany.
5. Uzasadnione jest rozszerzenie badań mikrobiologicznych na inne produkty spożywcze oraz rozszerzenie zakresu badań o inne wskaźniki mikrobiologiczne np. bakterie z rodzaju *Salmonella* czy

Staphylococcus. Badania takie mogłyby pomóc w określeniu takich metod przechowywania produktów spożywczych, które gwarantowałyby najlepszą jakość mikrobiologiczną.

Literatura:

1. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: *Mikrobiologia techniczna*, Tom 2, 2008
2. Ustawa z dnia 6 września 2001 r. o materiałach i wyrobach przeznaczonych do kontaktu z żywnością
3. Żakowska Z., Stobińska H.: *Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym*, Łódź, 2000
4. Wojtatowicz M., Stempniewicz R., Żarowskiej B.: *Mikrobiologia żywności*, Wrocław, 2009
5. Kołożyn-Krajewska D.: *Higiena produkcji żywności*, Warszawa, 2007
6. Trząskowska M.: *Jak bezpiecznie przechowywać żywność?*, 2011
7. Gawędzki J., Libudzisz Z.: *Mikroorganizmy w żywności i żywieniu*, Poznań, 2006
8. Molenda J.: *Zarys mikrobiologii żywności*, Wrocław, 2003
9. Steinka I.: *Mikrobiologia żywności i materiałów przemysłowych*, Gdynia, 2011
10. PN-ISO 4831:2007 *Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne zasady oznaczania liczby bakterii z grupy coli metodą najbardziej prawdopodobnej liczby*
11. PN-ISO 4833:2004 *Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów*
12. Bobrowski M.: *Biologia sanitarna. Materiały pomocnicze do ćwiczeń*, Białystok, 2002.

13. PN-ISO 7954:1999 *Mikrobiologia. Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni.*
14. Kordowska-Wiater M., Łukaszewicz B.: *Wpływ sposobu pakowania na jakość mikrobiologiczną pasztetów*, 2005.
15. Wójcik-Stopczyńska. B.: *Ocena stanu mikrobiologicznego mieszanek musli pochodzących z sieci handlowej*, 2003.